

Université de Montréal

**Amélioration de la prise de greffe hématopoïétique par
une thérapie cellulaire à base de cellules souches
mésenchymateuses**

par

Audrey Fortin

Département de pharmacologie, Université de Montréal

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître es Sciences (M.Sc.)
en pharmacologie
option pharmacogénomique

Aout 2011

© Audrey Fortin, 2011

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Amélioration de la prise de greffe hématopoïétique via une thérapie cellulaire à base de
cellules souches mésenchymateuses

Présenté par :

Audrey Fortin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-François Gauchat, président-rapporteur

Dr Christian Beauséjour, directeur de recherche

Dr Borhane Annabi, membre du jury

RÉSUMÉ

Le traitement du cancer à l'aide d'une exposition aux radiations ionisantes peut mener au développement de plusieurs effets secondaires importants, dont un retard de réparation et de régénération du tissu hématopoïétique. Les mécanismes responsables de ces effets demeurent encore inconnus, ce qui limite le développement de nouvelles approches thérapeutiques. À l'aide d'un modèle murin de prise de greffe, nos résultats démontrent que l'endommagement du microenvironnement par l'irradiation a un impact limitant sur le nichage hématopoïétique. Parce que le microenvironnement est composé principalement de cellules dérivées des cellules souches mésenchymateuses (CSM), nous avons évalué le potentiel des CSM à régénérer le tissu hématopoïétique par la reconstitution de la niche osseuse. Cette thérapie a mené à une augmentation remarquable du nichage hématopoïétique chez les souris irradiées. Les causes moléculaires impliquées dans le nichage hématopoïétiques sont encore inconnues, mais nous avons remarqué l'augmentation de la sécrétion de la cytokine « granulocyte-colony stimulating factor » (G-CSF) dans l'espace médullaire suite à l'irradiation. Le G-CSF est impliqué dans la mobilisation cellulaire et est fort possiblement nuisible à une prise de greffe. Nous avons évalué le potentiel d'une thérapie à base de CSM sécrétant le récepteur soluble du G-CSF afin de séquestrer le G-CSF transitoirement et les résultats obtenus démontrent que le blocage du G-CSF favorise le nichage hématopoïétique. Globalement, les données présentées dans ce mémoire démontrent que le microenvironnement osseux et le niveau de G-CSF dans la moelle sont importants dans le processus de nichage hématopoïétique et que la baisse du potentiel de régénération du tissu hématopoïétique suite à l'irradiation peut être renversée à l'aide d'une thérapie cellulaire de CSM génétiquement modifiées ou non.

Mots-clés: CSM, nichage hématopoïétique, irradiation, G-CSF, microenvironnement osseux

ABSTRACT

Cancer treatment using ionizing radiation may lead to significant side effects, including delayed hematopoietic tissue repair and regeneration. The mechanisms mediating these defects remain unknown, thus limiting the development of new therapeutic approaches. Using a mouse engraftment model, our results show that microenvironment damage by irradiation limits hematopoietic homing. Since the microenvironment is mainly composed of mesenchymal stem cells (MSCs)-derived cells, we evaluated the potential of MSCs to improve hematopoietic tissue regeneration by bone marrow niche reconstitution. This therapy led to remarkable enhancement of hematopoietic homing in irradiated mice. The molecular causes involved in hematopoietic homing remain unknown, but we noticed an increased in “granulocyte-colony stimulating factor” (G-CSF) secretion within the medullary space after irradiation. G-CSF is involved in cellular mobilization and may possibly be harmful to engraftment. We evaluated the therapeutical potential of MSC genetically-engineered to secrete a soluble G-CSF decoy receptor that would transiently sequester G-CSF. Results obtained show that G-CSF blocking improved hematopoietic homing. Overall, the findings presented in this thesis indicate that bone marrow microenvironment and G-CSF levels are important in hematopoietic homing process, and that the decline in hematopoietic tissue regeneration potential following irradiation can be reversed by cellular therapy using MSC genetically modified or not.

Key words: MSCs, hematopoietic homing, irradiation, G-CSF, bone marrow microenvironment

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	ix
REMERCIEMENTS	xi
CHAPITRE I	1
1.1 MISE EN CONTEXTE	1
1.2 CONTENU DU MÉMOIRE	3
CHAPITRE II	4
2.1 LA PROBLÉMATIQUE DE LA GREFFE HÉMATOPOÏÉTIQUE	4
2.2 LE CONDITIONNEMENT	8
2.2.1 Le conditionnement standard	8
2.2.1.1 La radiothérapie	8
2.2.1.2 La chimiothérapie	10
2.2.2 Le conditionnement à intensité réduite	13
CHAPITRE III	15
3.1 LES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES	15
3.2 LES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES	17
CHAPITRE IV	19
4.1 LA NICHE DES CSH	19
4.1.1 La niche ostéoblastique	20
4.1.2 La niche vasculaire	24
4.2 LES MOLÉCULES DE SIGNALISATION ET D'ADHÉSION	25

4.3 LES CYTOKINES	26
4.3.1 Le facteur de différenciation stromal 1 (SDF-1)	26
4.3.2 Le G-CSF	28
4.3.3 La Prostaglandine E ₂ (PGE ₂)	32
CHAPITRE V	33
5.1 L'UTILISATION DES CSM EN CLINIQUE	33
5.2 LES CSM EN TANT QU'AGENT THÉRAPEUTIQUE POUR AMÉLIORER LA PRISE DE GREFFE HÉMATOPOÏÉTIQUE	36
CHAPITRE VI	39
6.1 HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	39
6.2 OBJECTIFS	40
CHAPITRE VII	42
7.1 RÉSULTATS	42
<i>Article: Injection of a G-CSF decoy receptor as an alternative strategy to stromal cell therapy to increase homing</i>	
CHAPITRE VIII	72
8.1 DISCUSSION ET PERSPECTIVES	72
CHAPITRE IX	80
9.1 CONCLUSION	80
BIBLIOGRAPHIE	81
ANNEXE	xii
A1. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	xii
A2. ACCORD DES COAUTEURS	xiv

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Registre des donneurs de sang de cordon ombilical	5
Figure 2. Schéma de l'hématopoïèse	15
Figure 3. Aspect de la morphologie typique des cellules souches mésenchymateuses	17
Figure 4. Schéma de la niche osseuse supportant l'hématopoïèse	20
Figure 5. Modèle de signalisation entre BMPR1A et Wnt dans l'os.....	22
Figure 6. Structure du récepteur du G-CSF	28
Figure 7. Impact de la signalisation du récepteur du G-CSF sur l'activité biologique	29

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Ang-1/Tie2	<i>Angiopoïétine-1/Tie2</i>
ADN	Acide desoxyribonucleique
AP	<i>After purification</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATG	<i>Anti-T-lymphocyte globulins</i>
Bmp	<i>Bone morphogenetic protein</i>
Bmpr1a	<i>Bone morphogenetic protein receptor, type IA</i>
BP	<i>Before purification</i>
Ca ²⁺	Ion calcium
CaR	<i>Ca²⁺-sensing receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CFU	<i>Colony forming unit</i>
COX	Cyclooxygénase
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CHR	<i>Cytokine receptor homology</i>
CM	<i>Conditonned media</i>
CSF3	<i>Colony-stimulating factor 3</i>
CSM	Cellule souche mésenchymateuse
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CSP	Cyclosporine
CTR	<i>Control</i>
C-X-C	Cystéine-X-cystéine
CXCR4	Récepteur de SDF-1
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
G-CSFR	<i>Granulocyte colony-stimulating factor receptor</i>
GTP	Guanine triphosphate

GVC	Ganciclovir
Gy	Gray
GvHD	<i>Graft versus host disease</i>
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
IL	Interleukine
JAK	<i>Janus kinase</i>
LFA-1	<i>Leukocyte-function-associated antigen-1</i>
MMP	Metalloprotease de la matrice
NE	<i>Neutrophilic elastase</i>
NOD/SCID	<i>Non obese diabetic/severe combined immunodeficiency</i>
p53	Proteine 53 (suppresseur de tumeur)
PB	<i>Peripheral blood</i>
PGE2	Prostaglandine E2
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PPR	<i>PTH/PTHrP receptors</i>
PTH	<i>Parathyroid hormone</i>
sKitL	<i>Soluble kit ligand</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDF-1	<i>Stromal-derived growth factor 1</i>
solG-CSFR	<i>Soluble G-CSF receptor</i>
Stat	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TK	Thymidine kinase
TPO	Thrombopoïétine
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UFC	Unité formant des colonies
VCAM	<i>Vascular cell adhesion protein</i>
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>
WBM	<i>Whole bone marrow</i>
WNT	<i>Wingless</i>

REMERCIEMENTS

Ce projet n'aurait pas été possible sans le soutien de ma famille, amis et collègues, lesquels je remercie sincèrement de leur appui et de m'avoir motivé à persévérer tout au long de cette étape importante de ma vie académique.

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Dr Christian Beauséjour, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir permis d'accomplir ce projet d'envergure. De par sa passion pour les sciences et sa disponibilité à répondre à mes questions, il a su me motiver et me donner un environnement de travail stimulant.

Je voudrais aussi remercier Cynthia qui a été ma partenaire de laboratoire, toujours là pour m'aider, me donner des commentaires pertinents et pour tout le plaisir qu'on a eu ensemble. Je remercie également Oahn, notre assistante de recherche, pour sa disponibilité et support constant.

Je remercie aussi tous les autres membres du laboratoire, Basma, Vimal et Geneviève, ainsi que toute l'équipe du Dr Haddad pour tous les bons moments passés ensemble.

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 MISE EN CONTEXTE

En 2011, il est estimé qu'il y aura au Québec 46 500 nouveaux cas de cancer et plus de 20 000 décès qui y sont reliés. Le nombre de nouveaux cas continu de croître à mesure que la population augmente et vieillit, car le risque d'être atteint d'un cancer augmente drastiquement avec l'âge [1].

Les patients atteints du cancer reçoivent des traitements à base de drogues (chimiothérapie) et de radiations ionisantes (radiothérapie). Ces régimes sont utilisés seuls ou en combinaison pour leur effet anti-tumoral visant à enrayer les cellules cancéreuses. De plus, ils sont pratiqués comme conditionnement pour leur effet immunosuppresseur éliminant les cellules du système immunitaire.

Des problématiques observées lors du rétablissement des patients atteints du cancer est que le conditionnement induit des complications, telles que le développement d'un second cancer et des retards de régénération et réparations tissulaire. Plusieurs études évoquent l'impact majeur du conditionnement quant aux effets secondaires à long terme. De plus, les cellules sanguines sont très sensibles à ces traitements, impliquant que suite à ces thérapies, il est vital de transplanter de la moelle osseuse aux patients afin de régénérer les cellules hématopoïétiques. Cependant, la technique de greffe hématopoïétique couramment utilisée présente des taux de réussite de prises de greffe assez faible.

L'optimisation de nouvelles méthodes de transplantation de moelle osseuse et de conditionnement sont en développement afin améliorer la qualité et l'espérance de vie de des patients atteints du cancer.

1.2 CONTENU DU MÉMOIRE

Le sujet de mon projet de recherche porte sur l'amélioration de la prise de greffe de moelle osseuse chez les patients pré-conditionnés par l'exposition aux irradiations. Nous voulions élaborer une thérapie cellulaire afin de favoriser la régénération de la moelle osseuse. Pour ce faire, notre premier objectif était de favoriser le nichage des cellules transplantées à la moelle osseuse en effectuant une thérapie cellulaire afin de régénérer le microenvironnement osseux endommagé par l'irradiation. Notre deuxième objectif a été d'augmenter le nichage des cellules hématopoïétiques par le blocage d'une cytokine mobilisatrice. Un modèle de prise de greffe chez la souris a été développé au laboratoire afin de répondre à ces 2 objectifs.

Les prochains chapitres contiennent une revue de littérature couvrant des sujets pertinents dans le cadre de mon projet de recherche. Tout d'abord, le chapitre II contient des notions au sujet du conditionnement standard et d'intensité réduite. Au chapitre III, j'y traite des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et des cellules souches mésenchymateuses (CSM). Ensuite au chapitre IV, j'enchaîne avec les concepts de niche ostéoblastique et vasculaire, des molécules de signalisation et d'adhésion, puis des cytokines impliquées dans le processus de greffe hématopoïétique. Le chapitre V quant à lui est consacré à une révision des études cliniques utilisant des CSM comme outil thérapeutique pour traiter différentes pathologies, dont les défauts de réparation tissulaire. Les objectifs généraux de mon projet de recherche seront abordés au chapitre VI. Le chapitre VII contiendra un article en rédaction portant sur les résultats expérimentaux obtenus tout au long de ma maîtrise. La discussion des résultats se fera dans le chapitre VIII. Finalement, au chapitre IX j'élaborerai sur la conclusion et les perspectives par rapport aux résultats obtenus.

CHAPITRE II

2.1 LA PROBLÉMATIQUE DE LA GREFFE HÉMATOPOÏÉTIQUE

La transplantation de moelle osseuse a été développée dans le but de traiter les immunodéficiences congénitales et les désordres hématologiques [2, 3]. Cette technique est maintenant aussi utilisée dans le traitement des maladies auto-immunes et du cancer [4-9]. La transplantation de moelle osseuse vise à remplacer les cellules souches hématopoïétiques endommagées lors des traitements de chimiothérapie et radiothérapie. Dans les cas de maladies hématologiques et cancers sanguins, ces traitements ont pour but d'éradiquer les cellules pathologiques de la moelle osseuse avant d'effectuer la transplantation hématopoïétique. Dans les autres cas de cancers, la transplantation est nécessaire, car la chimiothérapie et radiothérapie visant les cellules cancéreuses ont aussi pour effet d'altérer les cellules hématopoïétiques saines du patient. Le tissu hématopoïétique étant très sensible à ces traitements, mène à une diminution en cellules sanguines et plaquettes, et augmente ainsi la susceptibilité aux infections et hémorragies [10]. La transplantation a alors pour but de reconstituer les CSH chez les patients subissant la chimiothérapie et/ou la radiothérapie.

Les greffes de moelle osseuse sont des procédures difficiles. D'abord, le nombre de cellules souches à greffer est un facteur limitant qui peut compromettre la réussite de la greffe hématopoïétique. En clinique, les CSH transplantées proviennent de prélèvements de sang périphérique mobilisé, de sang de cordon ombilical ou de la moelle osseuse. Le sang de cordon ombilical comme source de CSH est très intéressante et possède plusieurs avantages

comparativement à la moelle osseuse. Notamment, il y a l'accès et la disponibilité du matériel biologique, une fréquence plus élevée de CSH et une production plus élevée de progéniteurs pour un nombre équivalent de CSH [2, 3]. La création de banques publiques de sang de cordons a augmenté l'accessibilité des unités de sang de cordon pour la transplantation (voir graphique ci-dessous).

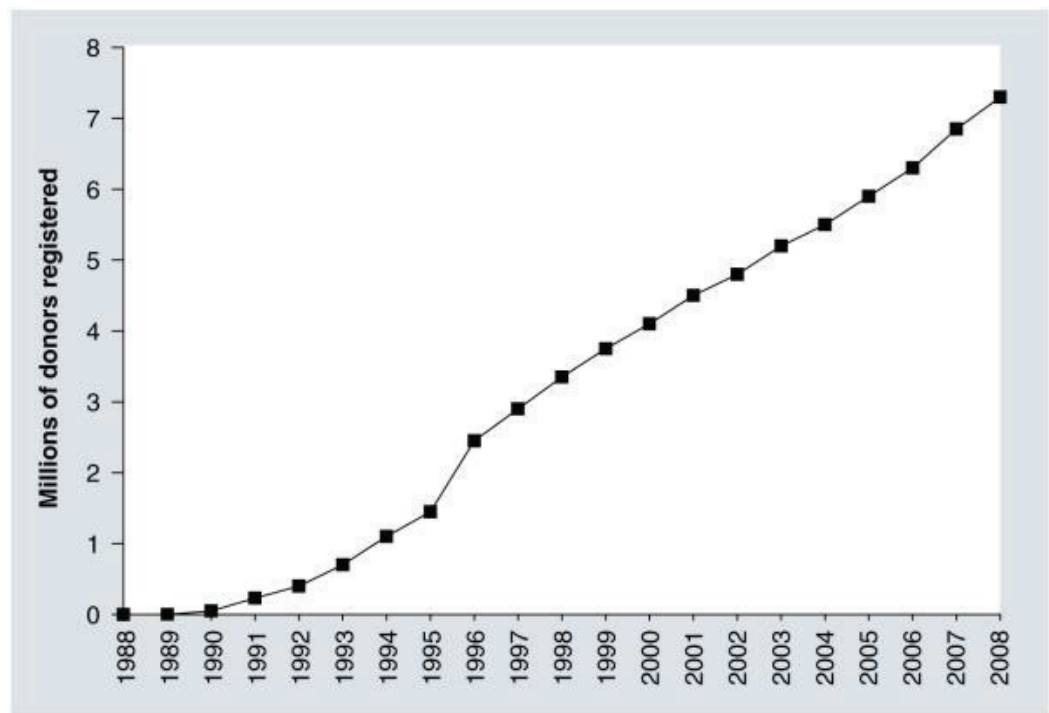


Figure 1 : Registre des donneurs de sang de cordon ombilical (données tirées du US National Marrow Donor Program).

Cependant, il existe un facteur limitant principal de cette source qui est le faible volume de sang de cordon qui résulte en un nombre insuffisant de cellules souches pour la prise de greffe chez un adulte. L'injection d'un nombre restreint de cellules n'est pas conseillé puisqu'il a été démontré qu'il existe un lien direct entre le nombre de cellules injectées et l'efficacité de la prise de greffe [11, 12].

Une autre problématique à la transplantation de moelle osseuse est le risque de développer la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) qui est une réaction des cellules immunitaires greffées contre les cellules de l'hôte. La GvHD est une des complications les plus fréquentes et les plus sérieuses suivant une transplantation allogénique. Cette maladie résulte en dommages induits immunologiquement aux tissus de l'hôte [13, 14]. Ces dommages sont dus à des interactions entre les cellules T du donneur et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) de l'hôte, puis à l'induction subséquente de cytokines proinflammatoires et d'effecteurs cellulaires [15]. Ces interactions se produisent lorsque les antigènes des leucocytes humains (HLA) de la greffe sont incompatibles avec ceux du receveur. Lors d'une transplantation de sang de cordon, il est recommandé d'avoir au maximum 1 à 2 disparités sur 6, sinon les risques de GvHD sont augmentés et la probabilité de la prise de greffe diminuée [16]. Les CPAs de l'hôte sont critiques pour l'induction de la GvHD par l'activation des cellules $CD4^+$ et $CD8^+$ du donneur. Les observations cliniques supportent le rôle des APCs dans le développement de la GvHD [17, 18] et donc, de cibler les CPAs de l'hôte pourrait être une stratégie prometteuse pour prévenir la GvHD [19].

La GvHD peut avoir lieu selon 3 conditions lors de la transplantation cellulaire allogénique: (i) le receveur est immunocompromis par le conditionnement pré-greffe (radiation/chimiothérapie) lui causant des dommages tissulaires, incluant l'altération de la barrière épithéliale intestinale et le relâchement de cytokines inflammatoires, (ii) le donneur et le receveur sont différents antigéniquement, ce qui active les CPAs et les facteurs inflammatoires, (iii) et la greffe du donneur contient des cellules effectrices, les cellules T, immunologiquement actives [20].

Plusieurs approches sont étudiées afin de réduire les cytokines proinflammatoires initiant la GvHD [21], incluant le développement de

méthodes non-myéloablatives et le blocage du TNF très tôt après la transplantation [22]. Les rôles des cytokines inflammatoires suivant un conditionnement myéloablatif ont été confirmés dans des modèles de transplantation murins et des observations cliniques. Les résultats des modèles murins démontrent le relâchement de cytokines inflammatoires post-irradiation [23-25] augmentant l'activation des CPAs [26, 27], tandis que les données cliniques mettent en évidence l'augmentation des niveaux de TNF- α chez les receveurs transplantés et l'utilité clinique des drogues bloquant le TNF [28].

Finalement, la transplantation de moelle osseuse est une technique risquée, plusieurs effets secondaires peuvent en découler débutant de façon précoce dans les 3 mois post-transplantation, et d'autre devenant apparents seulement des années ou des décennies plus tard. Les infections opportunistes, le plus souvent d'origine virale, sont la cause majeure de mortalité liée à la transplantation durant les 6 premiers mois après la transplantation, causée principalement par un délai dans la reconstitution immunitaire. La régénération du système immunitaire est un processus très complexe influencé autant par la greffe (dose cellulaire, histocompatibilité, sérologie du donneur) que par des facteurs liés au receveur (âge, thérapie précédente, conditionnement, exposition aux infections antérieures) [29]. La mortalité liée aux infections est observée dans plus de 50 % des décès après une transplantation de sang de cordon ombilical, dont la majorité surviennent dans les 100 premiers jours post-transplantation [12, 30-32]. D'autres effets physiologiques à long-terme sont observés chez les patients ayant subi des traitements de conditionnement pré-greffe incluant la dysfonction d'organes ou de tissus non-malins et des risques plus élevés de développer des cancers secondaires [33].

2.2 LE CONDITIONNEMENT

Le conditionnement associe habituellement plusieurs molécules de chimiothérapie avec ou sans radiothérapie, et il n'est pas rare d'ajouter des anticorps monoclonaux. La dose de chaque composante du traitement définit le caractère plus ou moins intensif du conditionnement.

2.2.1 Le conditionnement standard

2.2.1.1 La radiothérapie

La radiothérapie (irradiation corporelle totale) était auparavant utilisée seule, puis associée ensuite à une chimiothérapie de type cyclophosphamide [34]. Par la suite, d'autres agents chimiothérapeutiques y ont été associés au cours des années. Plusieurs études ont permis d'identifier les doses maximales utilisables avec la chimiothérapie. L'irradiation corporelle totale était initialement réalisée en une seule fois, quelle que soit la dose, menant à des effets secondaires à court, moyen et long terme. Le fractionnement de la dose a permis de réduire la toxicité liée à cette procédure [35].

La radiothérapie, aussi appelée irradiation, est une technique utilisant le rayonnement, généralement les rayons gamma (γ), afin d'éliminer les cellules via la mutation de leur ADN, ce qui les rend incapables de se développer et de se diviser. Les rayonnements γ sont des ondes électromagnétiques très énergétiques, émis par des atomes radioactifs lors de leur désintégration. L'unité de dose absorbée par la matière est le Gray (Gy) qui est équivalent à un Joule absorbé par kilogramme de matière. Dans les conditionnements standards en association avec du cyclophosphamide, l'irradiation corporelle totale est actuellement utilisée à des doses de l'ordre du 12 Gy [35].

L'action indirecte du rayonnement γ se produit via l'interaction entre les molécules biologiques et les radicaux libres. Les radicaux libres apparaissent suite à l'excitation et la radiolyse de l'eau, c'est-à-dire l'ionisation de molécules d'eau. Plusieurs études ont résumé les voies moléculaires et les mécanismes de blessures induites par irradiation [36-39]. L'irradiation affecte directement l'ADN, l'expression génétique et la production protéique. Au niveau tissulaire, les effets tels que le dépeuplement cellulaire, l'atrophie et la dégradation des fonctions tissulaires se manifestent dans les jours aux semaines suivant l'irradiation. L'irradiation perturbe le déroulement du cycle cellulaire dans la phase plus radiosensible soit G2 et M [40, 41]. De par l'interférence avec la mitose, ce sont les tissus qui se régénèrent le plus rapidement qui sont principalement touchés, comme la moelle osseuse, la peau, l'intestin, les gonades, les ovocytes et les voies respiratoires.

Il existe des systèmes de défense cellulaire afin de réparer ces dommages. Souvent, la réparation sera efficace. Cependant, dans les cas où les réparations sont imparfaites, les dommages à l'ADN induits par la gamma-irradiation peuvent conduire à la sénescence. Ce phénomène implique l'arrêt permanent et irréversible de la prolifération cellulaire en phase G1 [42]. Aussi, les cellules peuvent aller jusqu'à déclencher un cancer des années après l'irradiation. De plus, si les dégâts sont trop importants, les cellules seront éliminées via le processus de mort cellulaire programmée, l'apoptose [43]. À de très fortes doses d'irradiation, les systèmes de défense ne sont plus assez efficaces et l'importante mortalité cellulaire perturbe les fonctions vitales pouvant aller jusqu'au décès.

Donc, malgré que ce type de conditionnement soit très efficace pour enrayer les cellules cancéreuses, les traitements myéloablatifs par irradiation de forte intensité sont malheureusement associés à une toxicité importante qui restreint leur utilisation seulement chez les jeunes patients.

2.2.1.2 La chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement systémique médicamenteux ralentissant ou bloquant le développement, la multiplication et la propagation des cellules cancéreuses. Il existe de nombreux agents chimiothérapeutiques, employés seuls ou en association. Par exemple, la chimiothérapie standard, de forte intensité, consiste en une combinaison de cyclophosphamide, de busulfan et/ou de fludarabine. Chaque agent possède une structure chimique unique et diffère dans son principe d'action, dans son mode d'emploi et dans les effets secondaires qu'il peut engendrer.

Les agents antinéoplasiques agissent de façon systémique et peuvent s'administrer par voie orale, intraveineuse ou intramusculaire. La majorité de ces substances fonctionnent de manière non-spécifique par arrêt de la mitose (phase M), ce qui permet de cibler préférentiellement les cellules cancéreuses qui ont la caractéristique de se diviser rapidement. D'autres agents sont spécifiques à la phase S du cycle cellulaire, tels que l'arabinoside et le méthotrexate. De plus, il existe des substances qui ne sont pas spécifiques au cycle cellulaire, tels que les agents alkylants.

On compte plusieurs classes d'agents antinéoplasiques : les agents alkylants, les antimétabolites, les alcaloïdes, les inhibiteurs de la topoisomérase, les antibiotiques et autres agents, dont les interférons et les hormones.

Les agents alkylants sont nommés ainsi, car ils ont la capacité d'ajouter un groupe alkyle aux groupes électronégatifs présents dans les cellules cancéreuses et les cellules normales. Ils arrêtent la croissance de la tumeur en liant ensemble les nucléotides guanines dans la double hélice d'ADN. Ce mode d'action place les cellules dans l'incapacité de répliquer leur ADN, donc de se diviser [44, 45]. Ces agents n'agissent généralement pas de façon spécifique.

De plus, certains nécessitent une conversion *in vivo* en substances actives (le cyclophosphamide par exemple) [46, 47].

Les alcaloïdes bloquent la division cellulaire en empêchant la synthèse des microtubules et la formation du fuseau mitotique. La croissance tumorale est alors arrêtée puisque que ce fuseau est vital pour la division cellulaire [48].

Les inhibiteurs de topoïsomérases sont des enzymes essentielles qui maintiennent la topologie de l'ADN. L'inhibition de la topoïsomérase de type I ou de type II gênent à la fois la transcription et la réplication de l'ADN en altérant le superenroulement de l'ADN. Ce type d'agent bloque le cycle cellulaire en phase S-G2 [48].

Les antimétabolites sont des molécules qui prennent la place des nucléotides (purines ou pyrimidines), des composantes élémentaires de l'ADN. Ces éléments s'incorporent à l'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire, ce qui a pour effet d'arrêter le développement et la division cellulaire. De plus, les antimétabolites inhibent l'action de certaines enzymes essentielles à la formation de nucléotides et nucléosides [47].

Afin de diminuer les risques de mortalité reliés à la GvHD, la chimiothérapie peut aussi être utilisée comme traitement immunosuppresseur post-greffe ayant pour but d'inactiver ou d'éliminer les cellules T du donneur. Habituellement, ce genre de traitement consiste à combiner deux immunosuppresseurs tels que la cyclosporine A (un inhibiteur des calcineurines bloquant l'expression de l'IL-2 qui est impliquée dans la différenciation et la prolifération des lymphocytes T) et le méthotrexate (un inhibiteur de la dihydrofolate réductase bloquant la synthèse des purines) [18]. La déplétion des cellules T peut aussi être induite via l'utilisation d'anticorps, tel que l'alemtuzumab (anti-CD52) [18] et l'OKT3[®] (anti-CD3).

Ces traitements myéloablatifs par chimiothérapie de forte intensité sont malheureusement associés à une toxicité importante restreignant aussi leur utilisation aux jeunes patients. Par exemple, l'OKT3[®], un anticorps monoclonal IgG2 murin ciblant la chaîne CD3, un récepteur membranaire des cellules T, a été approuvé en 1986 pour le traitement des rejets de greffe [49]. Après l'injection d'OKT3[®], les cellules T disparaissaient de la circulation, résultats de l'opsonisation et de leur retrait de la circulation médié par les cellules mononuclées du foie et de la rate. L'avantage du traitement à base d'anticorps anti-lymphocytes T par rapport à l'irradiation corporelle totale est que cela affecte non seulement les lymphocytes du receveur, mais aussi ceux du donneur. Cependant, avant d'éliminer les cellules T, l'OKT3[®] active initialement les cellules T, ce qui résulte en la relâche de cytokines tel que l'IL-2, l'interféron γ , l'IL-6 et le TNF. Ces cytokines causent ce que l'on appelle le syndrome du relâchement de cytokines qui consiste en des fièvres, frissons, maux de tête, complications gastro-intestinales, et moins souvent en des méningites aseptiques et des encéphalopathies. Vu la disponibilité d'autres agents d'induction et la sévérité des effets secondaires associés avec le syndrome de relâchement de cytokines, il en résulte une diminution de l'utilisation de l'OKT3[®]. De plus, il est maintenant connu que l'OKT3[®] est immunogénique chez l'homme et qu'approximativement 50 % des patients développent des anticorps suite à un court traitement [50].

Le Bulsulfan est un autre exemple d'agent chimiothérapeutique toxique. Cette drogue utilisée depuis 1959 est un des agents anticancéreux les plus efficace, pouvant cependant mener à de nombreuses complications, tel que la fibrose pulmonaire [51].

2.2.2 Le conditionnement à intensité réduite

Du aux effets secondaires néfastes liés à la forte toxicité des traitements standards, des méthodes de conditionnement non-myéloablatif ont été élaborées. Depuis les années 1990, une variété de conditionnement à intensité réduite a été étudiée, combinant chimiothérapie réduite avec ou sans irradiation. La plupart de ces conditionnements chimiothérapeutiques sont basés sur l'administration de fludarabine et d'un agent alkylant (melphalan, cyclophosphamide ou busulfan), et aussi avec l'addition d'anticorps anti-lymphocyte T tel que l'ATG ou l'alemtuzumab [35].

Des études cliniques ont permis d'observer un effet durable de greffe-versus-leucémie chez les patients développant une GvHD aigüe ou chronique post-transplantation. Ces données encouragent le développement de méthodes non-myéloablatives, car elles démontrent que l'éradication partielle des cellules hématopoïétiques allogéniques transplantées est bénéfique, puisqu'en plus de restaurer la myéloablation, ces cellules mènent à l'éradication des cellules cancéreuses [37-39].

Cependant, le conditionnement à intensité réduite est limité par l'augmentation du risque de rejet d'allogreffe. En effet, sans un traitement myéloablatif complet, les cellules T du donneur et du receveur peuvent engendrer des réactions greffe-versus-hôte et hôte-versus-greffe. Il a été démontré dans une étude préclinique à l'aide d'un modèle canin, que l'immunosuppression post-greffe était en mesure de moduler simultanément les réactions hôte-versus-greffe, faciliter la prise de greffe et prévenir la GvHD, mais jusqu'à un certain point. Lors de cette étude, le conditionnement pré-greffe intensif était remplacé avec une immunosuppression post-transplantation de manière progressive. Il a été démontré que les lymphocytes T sont sensibles à l'irradiation et que la dose minimale nécessaire pour avoir une prise de greffe

avec succès était de 9.2 Gy chez 92 % des receveurs, sans immunosuppression additionnelle [52, 53]. À une dose de 4.5 Gy, l'ajout de cyclosporine (CSP) était nécessaire pour atteindre une prise de greffe substantielle [54]. Cependant, quand la dose d'irradiation corporelle totale était diminuée à une dose sub-létale de 2 Gy, l'immunosuppression post-greffe avec de la CSP seule était inefficace et toutes les greffes avaient été rejetées [55].

Finalement, les nouvelles méthodes d'intensité réduite présentant une diminution de toxicité tout en conservant leur potentiel de prise de greffe laissent entrevoir l'applicabilité de cette approche à des populations de plus en plus âgées ou dont l'état général représentait jusqu'à maintenant une contre-indication à la greffe avec conditionnement.

CHAPITRE III

3.1 LES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES

La CSH est responsable de l'hématopoïèse, un processus physiologique permettant la création et le renouvellement de toutes les cellules sanguines. En tant que cellules souches, elles sont capables d'auto renouvellement. De plus, elles possèdent un caractère multipotent leur permettant de se différencier et de donner naissance aux progéniteurs des lignées myéloïdes et lymphoïdes. Ces progéniteurs ont alors la capacité d'engendrer, après différenciation, tous les types de cellules sanguines (voir le schéma ci-dessous).

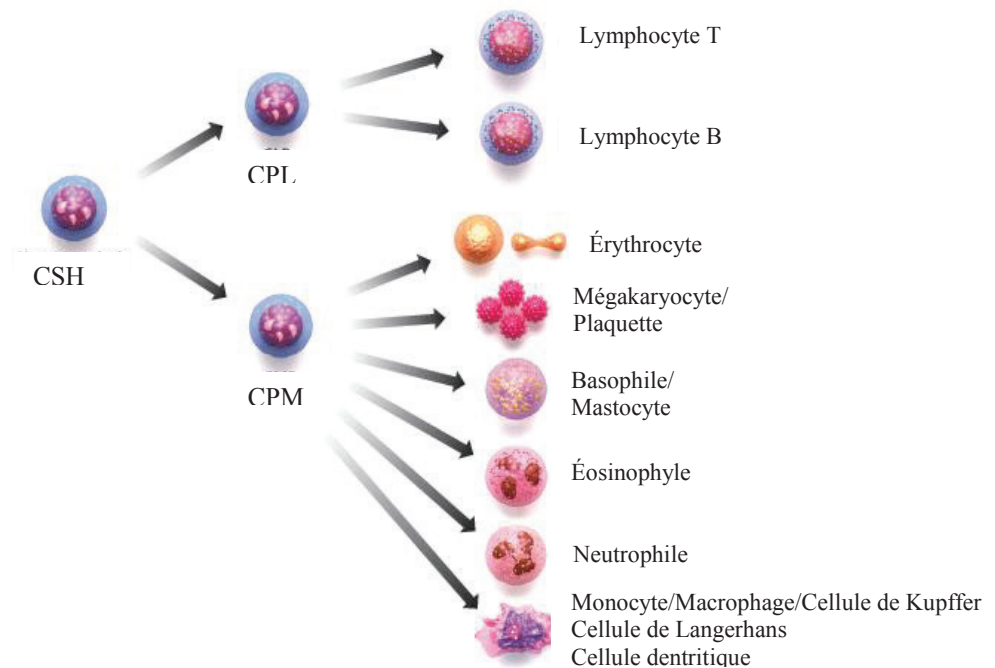


Figure 2 : Schéma de l'hématopoïèse (tiré de Sigma Aldrich, "Hematopoietic Stem Cell Pathway").

Du point de vue de la morphologie cellulaire, les CSH ressemblent à n'importe quel lymphocyte, soit une petite cellule ronde, non-adhérente avec un noyau rond et un petit cytoplasme par rapport au noyau. Il n'y a pas de façon directe pour identifier les CSH. Cependant, l'utilisation de marqueurs de surface permet l'identification d'une population enrichie en CSH. Les principaux marqueurs de surface de ces cellules sont le CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45 et c-kit. Il existe des différences entre les marqueurs murins et humains des CSH, cependant un marqueur couramment utilisé pour identifier et isoler une population de cellules progénitrices est le CD34.

Les cellules sanguines matures ont une durée de vie limitée ce qui nécessite un réapprovisionnement constant via la différenciation des CSH multipotentes [56]. La survie et la croissance des CSH sont régulés via des interactions avec la moelle osseuse, notamment avec les ostéoblastes [57, 58] et les cellules endothéliales vasculaires, lesquels font parti intégrante de la niche de support des CSH [57, 59, 60].

3.2 LES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES

C'est dans les années 1960-1970 que la présence de cellules stromales et de cellules formant de l'os dans la moelle osseuse a été décrite pour la première fois [61-63]. Une sous-population de cellules de la moelle osseuse démontrant un potentiel ostéogénique a été caractérisée selon son adhérence rapide au plastique des pétris de culture, son apparence fibroblastique [61, 64] et sa capacité d'unité formant des colonies (UFC). Cette capacité d'UFC permet le dénombrement de ces cellules lors de la culture *in vitro*. En fait, les cellules vivantes adhèrent au plastique et croissent pour former un regroupement de cellules facilement distinguable. C'est le même principe que la notion d'UFC lors du dénombrement de bactéries en pétri.

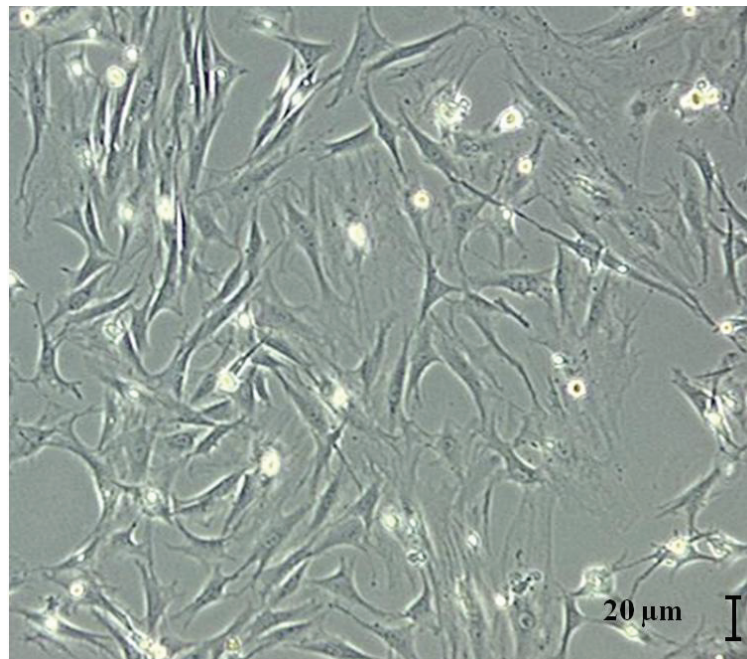


Figure 3 : Aspect de la morphologie typique des CSM [65].

Les CSM ont été isolées de plusieurs sources, humaines et animales, et de plusieurs tissus incluant le sang de cordon ombilical, le tissu adipeux, le muscle, la moelle osseuse et le foie [66, 67]. Il n'y a pas de marqueur spécifique aux CSM, cependant une panoplie de marqueurs est utilisée pour définir cette population cellulaire. Les CSM doivent exprimer à leur surface des molécules telles que le CD29, CD73, CD90, CD105, CD106, CD140 et CD166, mais ne doivent en aucun cas exprimer de CD31, CD45, CD34, CD14, CD133 et de CMH de classe II [68-70].

Les CSM sont multipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires (cellules nerveuses, de cartilage, etc.) et elles ont en plus la capacité d'auto renouvellement [71-73]. Au niveau de la moelle osseuse, les CSH constituent une population rare de progéniteurs multipotents capables de soutenir l'hématopoïèse par leur différenciation en ostéocytes, chondrocytes, cellules musculaires lisses et adipocytes, formant le microenvironnement osseux [74]. Les CSM isolées d'autres tissus démontrent cette même capacité de différenciation selon les conditions *in vitro* [75].

Par leur potentiel de différenciation multipotente, les CSM peuvent aussi réparer les tissus et organes en remplaçant les cellules endommagées [76, 77]. De plus, en réponse à une lésion tissulaire, les CSM peuvent migrer au site endommagé et aider à sa réparation par la production de molécules, telles que des facteurs de croissances, des cytokines et des antioxydants, leur procurant la capacité de moduler la réponse immunitaire [78-80].

En culture, il a été démontré que les CSM supportaient le développement hématopoïétique [81]. Les CSM produisent un grand nombre de cytokines et de protéines de la matrice extracellulaire, et expriment des molécules d'adhésion cellulaires, lesquelles sont toutes impliquées dans la régulation de l'hématopoïèse [81, 82].

CHAPITRE IV

4.1 LA NICHE DES CSH

Une niche de cellules souches est un site spécifique selon le tissu adulte où les cellules souches résidentes y subissent l'auto renouvellement et la différenciation. Structurellement, la niche est formée par des cellules de support procurant un microenvironnement pour les cellules souches, ainsi que par des signaux émanant des ces cellules de support [83-85]. Le concept de niche des CSH est le premier à être proposé en 1978 par Schofiels R. et son équipe pour décrire le microenvironnement limité dans lequel ces cellules résident [86]. Dans la moelle osseuse, les CSH utilisent soit la niche ostéoblastique, soit vasculaire, selon les circonstances.

L'habileté des CSH à mobiliser et à retourner ("homing") à la niche repose sur des reconnaissances moléculaires spécifiques, l'adhésion/désengagement cellule-cellule, la migration transendothéliale et finalement l'ancrage à la niche de la moelle osseuse [87-90].

4.1.1 La niche ostéoblastique

Chez les mammifères, la moelle osseuse est principalement composée de cellules hématopoïétiques quiescentes encastrées dans la structure osseuse. Une portion de ces cellules hématopoïétiques peut être trouvée à côté de la surface de l'endoste de l'os, lequel est bordé principalement par les ostéoblastes.

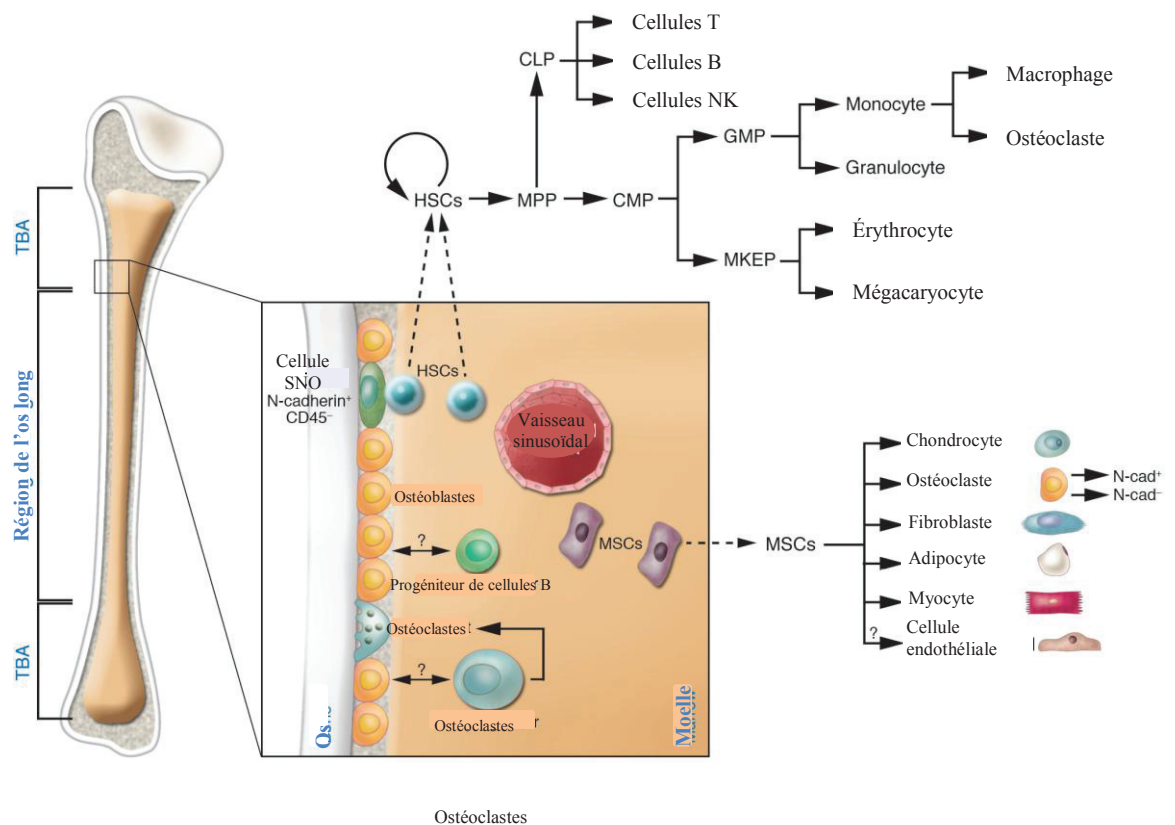


Figure 4 : Schéma de la niche osseuse supportant l'hématopoïèse [91].

Cet arrangement anatomique suggère une communication réciproque entre ces 2 types cellulaires et le rôle potentiel des ostéoblastes dans la régulation des CSH [83]. Cette notion est supportée par le fait que les ostéoblastes sont connus pour produire une variété de facteurs de croissance hématopoïétiques, tel que l'IL-6, c-kit, G-CSF et le facteur de croissance des

hépatocytes [92, 93]. Plusieurs évidences supportent un modèle selon lequel les CSH résidant à côté de la surface de l'endoste de l'os produisent des progéniteurs, qui eux migrent aux vaisseaux sanguins au centre de la cavité osseuse à leur maturité et s'y différencient [58, 94, 95].

L'importance de cette communication a été démontrée dans différentes études transgéniques où l'augmentation du nombre d'ostéoblastes dans la moelle corrélait avec une augmentation similaire de CSH [57, 59]. Les études sur le “bone morphogenetic protein receptor, type IA” (Bmpr1a) et “PTH/PTHrP receptors” (PPR) ont procuré des aperçus mécanistiques de l'expansion des CSH médiée par les ostéoblastes.

En effet, les protéines morphogéniques de l'os (Bmp) répriment la voie de signalisation de “Wingless” (WNT) pour maintenir les populations de cellules souches stables. Les signaux transduits par le Bmpr1a ne sont pas essentiels pour la formation ou prolifération des ostéoblastes, mais sont nécessaires en ce qui attrait au dépôt de la matrice extracellulaire [96]. D'autres études impliquant l'ablation conditionnelle de Bmpr1a chez la souris ont permis d'identifier un sous-ensemble d'ostéoblastes exprimant N-cadhérine, une molécule d'adhésion formant un complexe N-cadhérine/b-caténine avec les CSH, médiant l'attachement ou l'adhésion des CSH à leur niche [57]. Il a aussi été démontré que les CSH en différenciation expriment c-Myc, un régulateur négatif de N-cadhérine, ce qui favoriserait leur déplacement hors de la niche [97].

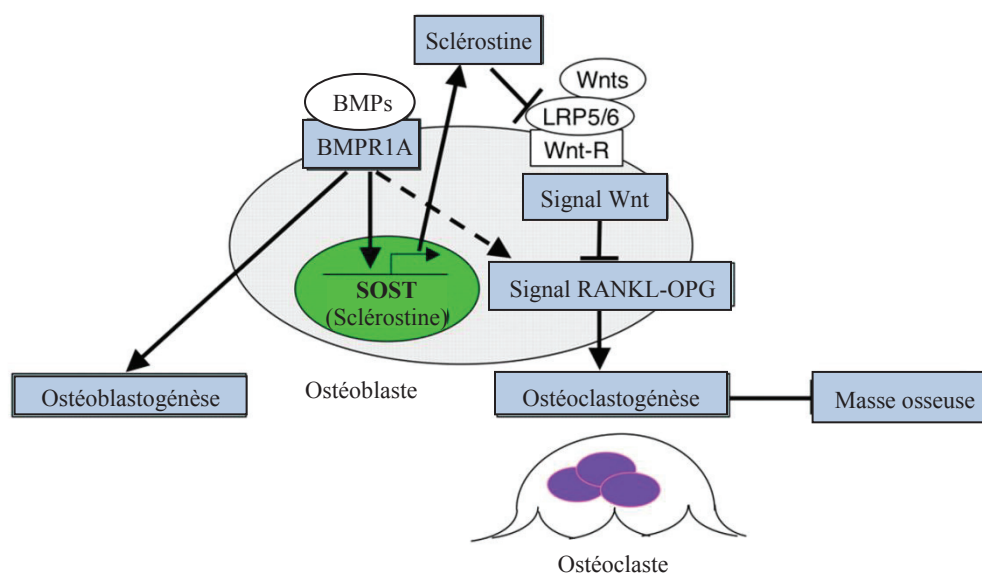


Figure 5 : Modèle de la signalisation entre BMPR1A et Wnt dans l'os [98].

D'autres molécules de la niche ostéoblastique sont impliquées dans la localisation des CSH quiescentes. Par exemple, Notch est exprimé par les CSH primitives et Jagged 1, son ligand, est exprimé par les ostéoblastes et les cellules stromales de la moelle osseuse. Des études ont démontré que l'activation de PPR, un récepteur impliqué dans l'homéostasie ionique osseuse et minérale [99], peut avoir pour effet d'augmenter le nombre de cellules ostéoblastiques, ce qui augmentera l'activité Jagged 1/Notch, et favorisera ainsi la prolifération des CSH [59]. De plus, il a aussi été démontré que la signalisation de Notch inhibait les programmes de différenciation induits par Wnt, ce qui favoriserait la rétention des CSH dans la niche osseuse [100].

Des évidences additionnelles supportent le rôle de la niche ostéoblastique dans le maintien des CSH. Une étude a été réalisée à l'aide d'un modèle murin transgénique exprimant la thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès sous le contrôle du promoteur du collagène $\alpha 1$, permettant l'expression conditionnelle de la TK par un traitement inductible au ganciclovir (GCV). Il a été démontré que l'expression de la TK déclenchait l'ablation des ostéoblastes,

ce qui menait à une diminution substantielle du nombre absolu de CSH et à la réduction de la cellularité de la moelle osseuse [101]. De plus, cette étude a montrée qu'avec le retrait du GCV, les ostéoblastes réapparaissaient dans l'os et que l'hématopoïèse reprenait dans la moelle osseuse. Ces observations supportent le rôle des ostéoblastes dans le maintien des CSH et la régulation de l'hématopoïèse.

4.1.2 La niche vasculaire

L'hématopoïèse et la vascularisation ont lieu de façon concurrentielle durant le développement. Comparativement à la niche ostéoblastique favorisant la quiescence des CSH, la niche vasculaire est un microenvironnement alternatif favorisant leur prolifération et différenciation [102]. Des études suggèrent que l'endothélium sinusoïdal favorise la prolifération et différenciation des cellules souches et progénitrices en leur procurant un microenvironnement plus riche en nutriments, avec une concentration en facteurs de croissance et oxygène plus élevée, et dans lequel les cellules sanguines matures sont ultimement relâchées dans la circulation périphérique [102, 103]. Par exemple, il a été démontré à l'aide d'un modèle murin mutant pour la thrombopoïétine (TPO), une hormone stimulant la thrombopoïèse, que les CSH étaient recrutées à la surface endothéliale et s'y différenciaient pour générer des plaquettes sanguines. En effet, cette étude a montré que les CSH quittaient la niche ostéoblastique et transloquaient à la niche vasculaire et s'y différenciaient en mégacaryocytes. Cette action impliquerait la métalloprotéinase MMP-9, laquelle médierait le relâchement du ligand kit soluble (sKitL) [102, 104].

4.2 LES MOLÉCULES DE SIGNALISATION ET D'ADHÉSION

Les molécules médiant le signalement et les interactions lors de l'adhésion entre les cellules souches et leurs niches peuvent influencer le comportement des CSH directement ou indirectement, via leur action sur leur niche. Les molécules impliquées dans la signalisation régulant la niche sont par exemple SCF/c-Kit, Jagged/Notch, angiopoïétine-1/Tie2 (Ang-1/Tie2) et le récepteur sensible au Ca^{2+} (CaR) [59, 95, 105-107], mais d'autres molécules sont connues pour jouer un rôle dans la régulation des cellules souches, telles que Wnt, BMP, TPO, IL-3 et IL-6.

Les molécules d'adhésion déterminantes pour la fonctionnalité de la niche osseuse incluent N-cadhérine/ β -caténine, "vascular cell adhesion protein/integrin" (VCAM/intégrine) et ostéopontine/intégrine β_1 [60, 83, 108]. Ces molécules jouent un rôle pour l'attachement ou la migration des cellules souches à la niche. Par exemple, la N-cadhérine et la β -caténine sont localisées à l'interface entre les CSH et la niche ostéoblastique ce qui facilite l'ancrage des CSH à cette niche [57]. Des études ont démontré le rôle des intégrines dans la médiation de la migration et du nichage de CSH à l'aide d'anticorps bloquant [109]. Par exemple, il a été découvert que l'ostéopontine contribue à la migration des CSH de la moelle osseuse vers la région de l'endoste via leurs interactions avec l'intégrine β_1 [60, 108].

4.3 LES CYTOKINES

4.3.1 Le facteur de différenciation stromal 1 (SDF-1)

Le SDF-1 est une chimiokine de la famille C-X-C qui a été isolée pour la première fois d'une lignée de cellules de la moelle osseuse murine [110]. Cette cytokine est exprimée sous 2 isoformes presque identiques dérivant d'un épissage alternatif, soit le SDF-1 α et le SDF-1 β , dont la différence se trouve dans les 4 derniers acides aminés de SDF-1 β absent chez SDF-1 α . Les différences fonctionnelles et biologiques entre les isoformes de SDF-1 ne sont pas clairement décrites [111].

Le SDF-1 joue plusieurs rôles importants via l'activation de protéines G couplées à son récepteur CXCR4 [112-114]. Cette cytokine est exprimée dans plusieurs tissus durant le développement, souvent avec une expression juxtaposée de son récepteur le CXCR4 [115]. Dans la moelle osseuse, le SDF-1 est impliqué dans la mobilisation, le nichage, la colonisation et la prolifération des CSH, et est étroitement associé à la reconstitution hématopoïétique après une transplantation de moelle osseuse [116-121]. Les cellules endothéliales, les ostéoblastes et les cellules stromales expriment constitutivement le SDF-1, et toutes les CSH expriment le CXCR4 [122-124].

Le SDF-1 est un chimioattractant puissant pour les cellules hématopoïétiques exprimant l'antigène CD34⁺ [125]. Il a été démontré dans un modèle de souris NUDE que la surexpression de CXCR4 par les cellules progénitrices hématopoïétiques humaines et autres cellules sanguines augmente la prise de greffe de moelle osseuse, alors que des anticorps dirigés contre le CXCR4 l'inhibent [8]. De plus, il a été démontré que les ostéoblastes et les cellules endothéliales de la moelle expriment SDF-1 ce qui permet de localiser les cellules progénitrices hématopoïétiques à la moelle [126-128]. Le SDF-1 a

aussi un rôle dans la migration transendothéliale des CSH médiée par E et P-sélectine [129]. L'activation des molécules d'adhésion comme "very late antigen-4" (VLA-4) et "leukocyte-function-associated antigen-1" (LFA-1) est aussi requise pour ce processus et pour la migration subséquente à la surface des ostéoblastes [102]. Les GTPases Rho, Rac et Rac2, en réponse aux signaux de SDF-1, sont aussi impliquées dans la régulation de la mobilisation et du nichage des CSH [130]. Par ailleurs, un traitement avec AMD-3100, un antagoniste spécifique de CXCR4, induit rapidement et drastiquement la mobilisation des CSH hors de la niche ostéoblastique, autant chez l'homme que chez la souris [131-133].

SDF-1 joue aussi un rôle important par rapport aux fonctions biologiques et physiologiques des CSM [134, 135]. Lorsqu'un site est endommagé, l'augmentation de l'expression du SDF-1 agit comme chimioattractant recrutant les CSM circulantes, lesquelles sont nécessaires pour la réparation tissulaire. Il a été observé que le relâchement local de SDF-1 favorisait le recrutement des CSM et la régénération tissulaire dans plusieurs organes, tels que le foie [136], le cœur [137, 138], le cerveau [139], les reins [140] et de la peau [141].

4.3.2 Le G-CSF

Le G-CSF, aussi connu sous nom de “colony-stimulating factor 3” (CSF 3), a été reconnu et purifié pour la première fois en 1983 chez la souris [142], tandis que la forme humaine n’a été clonée qu’en 1986 [143, 144]. Le gène du G-CSF contient 4 introns et mène à la formation de 2 polypeptides par épissage différentiel de l’ARNm [143].

Le récepteur du G-CSF est une protéine transmembranaire avec une large région extracellulaire incluant les domaines “immunoglobuline-like”, trois domaines fibronectines de type III et le domaine d’homologie des récepteurs de cytokines (CRH) possédant une signature de résidus de cystéines, et un motif de 5 acides aminés (W-S-X-W-S) caractéristique de la classe I de la superfamille des récepteurs de cytokine [145].

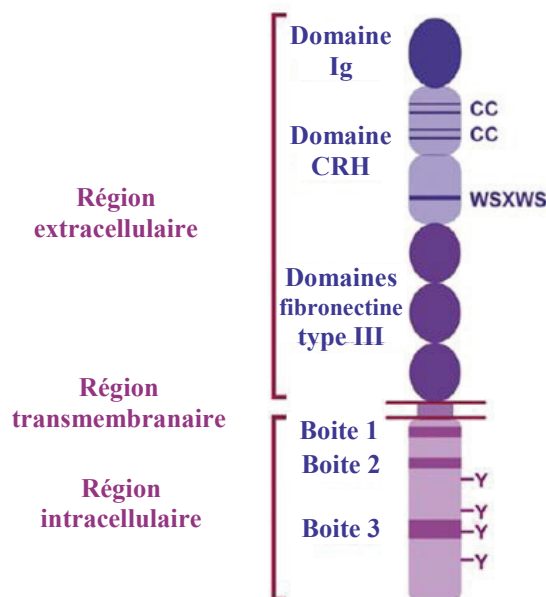


Figure 6 : Structure du récepteur du G-CSF [145].

La région intracellulaire n'a pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque, mais contient 2 motifs conservés de la membrane proximale, Box 1 et Box 2, induisant l'activation de la kinase Jak, ainsi que le motif distal Box 3, commun à la sous-famille des glycoprotéines 130 (CD130) et des résidus de tyrosines spécifiques importants pour la transduction de signal [146, 147].

Le récepteur du G-CSF est exprimé par plusieurs cellules du système hématopoïétique incluant les CSH, les progéniteurs myéloïdes, les granulocytes, les neutrophiles, les monocytes et lymphocytes, mais est aussi exprimé par les cellules des tissus non-hématopoïétiques, telles que les cardiomyocytes, les précurseurs neuronaux, les cellules endothéliales et le tissu placentaire [146]. La liaison du récepteur et de son ligand, le G-CSF, mène à la multimérisation du récepteur et l'activation de plusieurs cascades de signalisation intracellulaires incluant les voies Jak/Stat/Socs, Ras/Raf/Erk et PI3-kinase/Akt, lesquelles mènent ultimement à des changements transcriptionnels qui ont un impact sur la survie, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire [146].

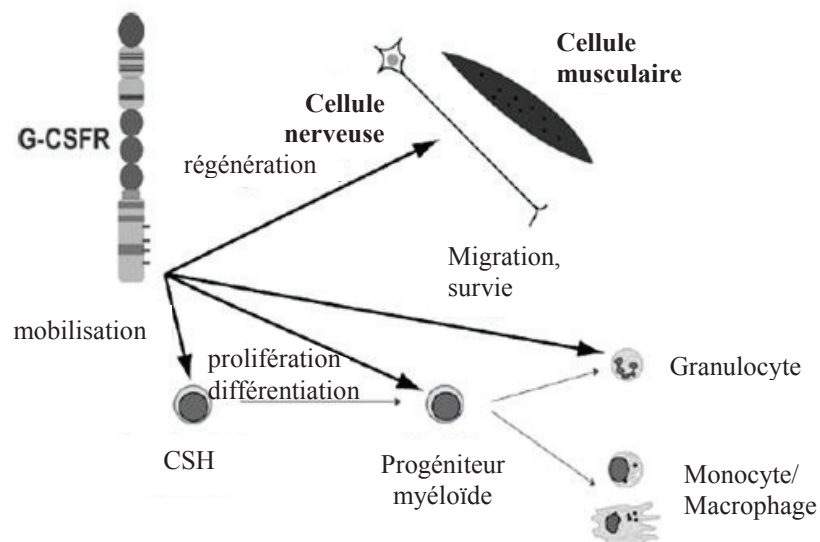


Figure 7 : Impact de la signalisation du récepteur du G-CSF sur l'activité cellulaire [145].

Plusieurs étapes de l'hématopoïèse sont médiées via l'action du G-CSF. Entre autre, cette cytokine supporte la formation de colonies myéloïdes immatures pouvant se différencier en toutes les lignées myéloïdes, induire la prolifération et la différenciation des cellules de lignées myélomonocytiques [144, 148], et augmente la fonction des neutrophiles et des plaquettes matures [149, 150]. De plus, l'implication du G-CSF dans la neutropoïèse a été démontrée à l'aide de souris déficientes en G-CSF ou de son récepteur [146], et chez les patients exprimant constitutivement des mutants hypomorphiques du récepteur du G-CSF [151], modèles exhibant tous une neutropénie. Le G-CSF est aussi connu pour être impliqué dans la myélopoïèse. En effet, une déficience en progéniteurs de granulocytes et de macrophages a été observée chez les souris G-CSF^{-/-} [146].

La signalisation du G-CSF régule aussi la mobilisation des CSH hors de la moelle osseuse [152], via un signal de transactivation indirecte, c'est-à-dire indépendant de l'expression du récepteur du G-CSF sur ces cellules [152]. La mobilisation induite par le G-CSF est médiée par 3 mécanismes distincts, probablement inter-reliés. Premièrement, par l'induction d'enzymes protéolytiques telles que l'élastase des neutrophiles (NE), la cathepsine G et les métalloprotéinases 2 et 9 (MMP-2 et MMP-9), lesquelles inactivent SDF-1 via un clivage de sa séquence en N-terminal. Deuxièmement, par l'atténuation de la fonction des molécules d'adhésion clés, comme les intégrines. Et troisièmement, par la perturbation de la signalisation de la cytokine SDF-1 via son récepteur CXCR4. De plus, il a été démontré que le G-CSF provoque la diminution du niveau de SDF-1 dans la moelle osseuse relativement au sang et autres tissus, ce qui établit un gradient chimioattractant facilitant la mobilisation cellulaire [153].

En clinique, le G-CSF est largement utilisé pour récolter des CSH et cellules progénitrices nécessaires aux transplantations de moelle osseuse [154].

Plusieurs applications du G-CSF en médecine régénérative sont en émergence, comme par exemple l'utilisation de cette cytokine en tant que neuroprotecteur; stimulant de la neurogénèse et inhibant l'apoptose et l'inflammation [155, 156].

4.3.3 La Prostaglandine E₂ (PGE₂)

Une autre molécule de signalisation pouvant affecter la niche osseuse est la PGE₂. Les prostaglandines sont dérivées de l'acide arachidonique produit via l'activation des cyclooxygénases 1 et 2 (COX-1 et COX-2) dans plusieurs tissus où elles sont impliquées dans les processus physiologiques et pathologiques [157].

La PGE₂ est l'écosanoïde le plus abondant et le médiateur de plusieurs systèmes physiologiques [158]. La PGE₂ peut cibler les composantes stromales et hématopoïétiques de la moelle osseuse. Elle est connue pour avoir des effets à la fois inhibiteurs et stimulateurs sur la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques [159-164], ce qui lui confère plusieurs rôles dans l'hématopoïèse. Par exemple, il a été démontré que la PGE₂ inhibait la croissance des granulocytes et des macrophages humains *in vitro* [165, 166] et la myélopoïèse *in vivo* [167], mais stimulait l'érythropoïèse et les cellules progénitrices de lignées multiples de façon dose-dépendante [164, 168]. La PGE₂ peut aussi stimuler les ostéoblastes humains et murins [169-176] vu son implication dans la résorption osseuse [177] et peut à la fois inhiber ou stimuler les cellules ostéoclastiques, dépendamment du modèle expérimental utilisé [178-181]. De plus, l'hormone parathyroïde (PTH), connue pour favoriser la prolifération indirecte des CSH via son effet sur les cellules ostéoblastiques dans la moelle osseuse, est en fait un des principaux stimulateurs de la PGE₂ [182-185].

CHAPITRE V

5.1 L'UTILISATION DES CSM EN CLINIQUE

La réparation de tissus endommagés par l'utilisation de cellules souches dérivées de la moelle osseuse ou du sang représente une approche novatrice en médecine régénérative. Les CSM sont utilisées en clinique en tant qu'outil thérapeutique grâce à leur capacité d'auto renouvellement, de différenciation et d'immunomodulation.

Plusieurs études cliniques visent à traiter la GvHD à l'aide de CSM. La GvHD chronique est une des plus grandes limitations au succès des greffes allogéniques de CSH. Afin de prévenir la GvHD, les patients recevant une allogreffe doivent subir des traitements immunosuppresseurs à long terme. Selon les statistiques, le tiers des patients ne réagissent pas à la première ligne de thérapie consistant en une combinaison de corticoïde et d'inhibiteur de calcineurine, ce qui donne un pronostique peu encourageant à ces patients [186].

Pour aider la prévention de la GvHD, des études cliniques visent à utiliser une thérapie à base de CSM pour leur propriété immunomodulatrice unique, incluant l'inhibition de la prolifération des cellules T stimulées par des allo-antigènes et mitogènes, et la prévention de l'activité cytotoxique des cellules T. Par exemple, une étude en phase II en cours a pour objectif d'évaluer la sécurité et l'efficacité d'infusions de CSM cultivées *ex vivo* pour le traitement de patients ayant développé la GvHD [187].

D'autres études cliniques utilisent les CSM dans le traitement des GvHDs, comme c'est le cas des investigations menées afin de déterminer les effets secondaires et la meilleure dose de CSM dans le traitement de la GvHD

aigüe ou chronique chez les patients subissant une transplantation de cellules souches [188-190].

Les CSM sont aussi utilisées en clinique dans les traitements d'infarctus du myocarde. Plusieurs études cliniques sont en cours, car les maladies cardiovasculaires sont considérées comme étant une des plus grandes causes de mortalité. Les cardiomyopathies ischémiques se définissent par des dommages permanents dans certaines aires du cœur qui sont privées de sang lors d'une attaque cardiaque. Le rétablissement après une attaque cardiaque peut être géré via une médication et des changements au style de vie, mais ces traitements ne peuvent pas renverser tous les dommages générés au cœur. Les CSM sont considérées comme des agents thérapeutiques intéressants pour une thérapie cellulaire via une injection intracoronarienne. Des études sont en cours pour évaluer si cette méthode est sécuritaire pour réparer les dommages causés lors d'un infarctus du myocarde [191, 192].

Les CSM peuvent aussi être utilisées lors de traitements d'une défaillance du foie. Cette maladie présente des symptômes cliniques dramatiques pouvant aller jusqu'à des nécroses massives des cellules du foie. À ce jour, la transplantation du foie est la seule option thérapeutique disponible pour les patients. Cependant, le manque de donneurs, les complications chirurgicales et les coûts élevés causent de sérieux problèmes. Des études ont démontré que les CSM dérivées de la moelle osseuse pouvaient remplacer les hépatocytes du foie endommagé et restaurer la défaillance du foie, puis contribuer à sa régénération. Une étude clinique est présentement en cours afin d'évaluer la sécurité et l'efficacité d'un traitement via une transfusion intraveineuse de CSM de sang de cordon ombilical pour les patients présentant une défaillance du foie [193].

Les CSM sont présentement utilisées d'autres essais cliniques notamment pour l'élaboration de traitements pour de la maladie de Crohn, le diabète de type I et des scléroses multiples [75].

Finalement, beaucoup d'études portant sur l'application de techniques de modifications géniques des CSM démontrent que ces cellules peuvent être utilisées comme un outil de thérapie cellulaire très intéressant. La capacité d'auto renouvellement et la possibilité d'amplifier les CSM *in vitro* sont des atouts permettant facilement leur utilisation en laboratoire. De plus, plusieurs études ont démontrées que les CSM sont faciles à transduire avec une variété de vecteurs et que cela ne semble pas affecter leur croissance. Les CSM sont considérées comme d'excellents véhicules pour le transfert de gène dans les essais cliniques. Il a été rapporté dans plusieurs modèles animaux que les CSM conservaient leur activité biologique après une transfection génique via des vecteurs rétroviraux et qu'elles avaient la capacité d'exprimer le gène d'intérêt, par exemple l'IL-3, les facteurs humains VIII et IX, et l'érythropoïétine humaine, et ce pour de longue périodes *in vivo* [194].

5.2 LES CSM EN TANT QU'AGENT THÉRAPEUTIQUE POUR AMÉLIORER LA PRISE DE GREFFE HÉMATOPOÏÉTIQUE

Pour la transplantation hématopoïétique, il est primordial d'acquérir un état de tolérance ou d'insensibilité immunologique, et de régénérer le microenvironnement osseux. Plusieurs évidences montrent que les CSM peuvent faciliter ces processus.

Plusieurs études utilisant les CSM en tant qu'agents thérapeutiques pour l'amélioration de la prise de greffe hématopoïétique ont été menées dans différents modèles animaux. Par exemple, les résultats d'infusions systémiques de CSM allogéniques dérivées de la moelle osseuse de babouins ont montré une suppression de la prolifération des lymphocytes et le prolongement de la survie des greffes allogéniques comparativement aux animaux ne recevant pas de thérapie cellulaire à base de CSM [195]. D'autres études sur des souris NOD/SCID montrent que la co-infusion de CSM et de CSH dérivées de sang de cordon et de placenta exprimant le CD34⁺ est associée avec l'augmentation de la prise de greffe hématopoïétique [196, 197]. Il est à noter que l'amélioration de la prise de greffe via une thérapie cellulaire de CSM a lieu lorsque les doses de CSH transplantées sont particulièrement faibles. D'autres études chez les primates non-humains ont démontré que la co-transplantation de CSM améliorerait la prise de greffe de CSH après une transplantation intra-osseuse autologue [198].

Les résultats expérimentaux obtenus par les expériences *in vitro* et dans les modèles animaux concernant les propriétés immunomodulatrices et l'amélioration de la prise de greffe des CSM ont généré un intérêt quant à leur

application clinique lors de transplantations de moelle osseuse, dans le but de prévenir le rejet de greffe et de faciliter la restauration hématopoïétique.

Cependant, les résultats chez l'homme sont contradictoires. Le premier essai clinique utilisant des CSM pour accélérer la régénération hématologique a été effectué chez des patients atteints du cancer du sein via leur co-infusion avec des CSH dérivées de sang périphérique. Aucune toxicité reliée aux CSM n'a été rapportée et une reconstitution hématopoïétique rapide a été notée [199]. Après ces résultats, plusieurs études de phase I et II ont été menées afin d'évaluer la sécurité de l'infusion de CSM chez les patients atteints de désordres hématologiques recevant une transplantation de CSH allogénique [200]. Les résultats démontrent encore que la co-infusion de CSM n'a pas été associée avec des effets délétères; que la reconstitution hématopoïétique est rapide pour la plupart des patients, et que les temps de prise de greffe de neutrophiles et de plaquettes; et qu'une GvHD modérée à sévère est observée seulement chez 28 % des patients.

Cependant, d'autres études pédiatriques évaluant la sécurité et l'efficacité de la co-transplantation de CSM avec des CSH dérivés de sang de cordon ombilical ont été menées. Les résultats démontrent que cette technique est faisable et sécuritaire, mais cette fois-ci aucune différence n'a été observée en ce qui attrait aux taux de prise de greffe et aux vitesses de régénération hématologique entre les groupes de patients traités ou non avec des CSM [196, 201]. De plus, il a été démontré que chez des patients recevant une transplantation de sang de cordon auxquels on administrait des CSM au moment de la transplantation ne présentaient aucun effet sur la cinétique des cellules greffées, tout comme sur la prévention de la GvHD [202].

Ces derniers résultats indiquent que la co-transplantation de CSH et de CSM est sécuritaire, mais il reste incertain que les CSM soient réellement

efficaces dans l'amélioration de la prise de greffe hématopoïétique et pour l'accélération de la vitesse de reconstitution hématologique. Les résultats expérimentaux contradictoires entre les modèles *in vivo* et *in vitro* pourraient être attribués à l'hétérogénéité des populations cellulaires de CSM dépendamment de la source tissulaire animale et humaine. De plus, les mécanismes par lesquels les CSM pourraient favoriser la prise de greffe hématopoïétique lors d'une co-transplantation restent controversés. En fait, si l'action des CSM est de moduler la prise de greffe hématopoïétique via des mécanismes immunomodulateurs ou de régénération du microenvironnement osseux, la présence des CSM transplantées dans la niche osseuse devrait être nécessaire. Cependant, un grand nombre d'études ont documenté que les CSM ne nichent pas à la moelle osseuse [203, 204]. Suite à une co-transplantation, il a aussi été démontré que les cellules stromales de la moelle demeure d'origine du receveur dans la majorité des patients [201, 205-207].

Finalement, plusieurs résultats mettent en évidence l'implication des CSM dans la prise de greffe hématopoïétique. Cependant, d'autres études devront être menées afin de mieux comprendre les mécanismes induits par les CSM.

CHAPITRE VI

6.1 HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

La réparation de tissus endommagés par l'utilisation de cellules souches dérivées de la moelle osseuse ou du sang représente une approche novatrice en médecine régénérative. Lors de greffes hématopoïétiques, le patient est conditionné par de la chimiothérapie et de l'irradiation afin d'éliminer les cellules hématopoïétiques et souvent cancéreuses du receveur. Malheureusement, ces traitements endommagent aussi l'os du receveur, dont les CSM ayant la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires formant une niche osseuse aux cellules hématopoïétiques. Les causes moléculaires impliquées dans le nichage des cellules hématopoïétiques à la moelle sont encore inconnues. Cependant, nous avons remarqué la sécrétion d'une cytokine (G-CSF) dans l'espace médullaire suite à l'irradiation.

Notre hypothèse de travail est que l'altération du microenvironnement osseux aurait un impact limitant sur la prise de greffe hématopoïétique. De plus, G-CSF étant une cytokine impliquée dans la mobilisation cellulaire, l'augmentation de son expression dans l'espace médullaire est fort possiblement nuisible à la prise de greffe.

6.2 OBJECTIFS

Notre projet de recherche a été élaboré dans le but d'améliorer la prise de greffe hématopoïétique suite à l'exposition aux radiations ionisantes.

- Notre premier objectif a été de déterminer si la régénération du microenvironnement osseux par thérapie cellulaire pouvait faciliter la restauration de l'hématopoïèse.
- Notre deuxième objectif était d'évaluer si le blocage transitoire du G-CSF, empêchant son activité mobilisatrice sur le CSH, favoriserait le nichage hématopoïétique.

À l'aide d'un modèle de prise de greffe chez la souris, nous avons étudié le potentiel des CSM génétiquement modifiées ou non dans le processus d'amélioration de la prise de greffe. Afin de répondre à ces objectifs, nous avons voulu déterminer si l'injection de CSM avait un effet bénéfique sur le nichage hématopoïétique des CSH, suite à l'irradiation. De plus, nous avons voulu évaluer si l'injection de CSM augmentait le nichage en absence de dommage au stroma induit par l'irradiation. Finalement, nous avons vérifié l'effet du blocage de la mobilisation cellulaire induite par le G-CSF via l'injection de CSM modifiées génétiquement pour surexprimer et sécréter le récepteur soluble recombinant du G-CSF.

Les résultats obtenus au cours de ce projet de recherche sont présentés sous forme d'un article qui est présentement en rédaction. Ceux-ci démontrent que l'irradiation endommage le microenvironnement osseux et augmente le niveau de G-CSF dans la moelle osseuse, et que ce sont les principales causes

diminuant l'efficacité du nichage hématopoïétique. Fort heureusement, la thérapie à base de CSM peut renverser les effets néfastes dus à l'irradiation.

CHAPITRE VII

7.1 RÉSULTATS

Injection of a G-CSF decoy receptor as an alternative strategy to stromal cell therapy to increase homing

Audrey Fortin^{1,2}, Cynthia L. Carbonneau^{1,2}, Basma Benabdallah^{1,2} and Christian M. Beauséjour^{1,2}

¹ Centre de recherche du CHU Ste-Justine, ² Département de pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author: Christian M. Beauséjour Ph.D., CHU Ste-Justine

ABSTRACT

Patients treated for cancer therapy using ionizing radiation have delayed tissue repair and regeneration. The mechanisms mediating these defects remain unknown, thus limiting the development of therapeutic approaches. Using an engraftment model, we investigated the mechanisms by which irradiation exposure limits hematopoietic tissue regeneration. Our results show that microenvironment damage by irradiation limits hematopoietic homing in irradiated mice, compared to non-irradiated mice. Because the microenvironment is mainly composed by mesenchymal stem cells (MSCs)-derived cells, we evaluated the potential of MSCs to improve hematopoietic tissue regeneration by bone marrow niche reconstitution in irradiated mice. Injection of MSCs led to remarkable enhancement of hematopoietic homing in mice exposed to irradiation. We also found that increase G-CSF level, a cytokine implicated in cellular mobilization, in the medullary space following irradiation may possibly be harmful to engraftment. We evaluated the potential of MSCs secreting a soluble G-CSF decoy receptor therapy to sequester G-CSF transiently, and results obtained show that G-CSF blocking improved hematopoietic homing. Overall, our findings indicate that bone marrow microenvironment and G-CSF level are important in hematopoietic homing processes, and that the decline in hematopoietic tissue regeneration potential following irradiation can be reversed by cellular therapy of MSCs genetically modified or not.

Key Words: MSCs, hematopoietic homing, irradiation, G-CSF, bone marrow microenvironment

INTRODUCTION

Umbilical cord blood (UCB) cells are being increasingly used as an alternative source for hematopoietic stem cell transplantation (review by Rocha and Broxmeyer) [1]. Despite several advantages such as greater availability and immune tolerance, the UCB contains a limited number of hematopoietic stem cells (HSC) available for transplantation. Limited HSC supply, combined with the low level of these cells returning back to the marrow (approximately 1%, a term referred to as homing), can translate into an increased risk of graft failure and delayed hematopoietic engraftment [2].

Low level homing is observed independently of the source of HSC injected and therefore numerous efforts have been made to enhance this important physiological process. Our comprehension of homing is limited to the role of some adhesion molecules and cytokines. In particular, the stromal cell derived factor-1 alpha (SDF-1 α), a chemoattractive cytokine present in the marrow niche, has an important role in homing of HSC [3,4]. Conversely, injection of the granulocyte cell stimulating factor (G-CSF), a cytokine playing an essential role in granulopoiesis, induces rapid stem cell mobilization, and thus the egress of HSC from the bone marrow [5,6].

Different approaches are being investigated to increase homing and engraftment. The injection of a higher number of HSC through the recent development of *ex vivo* expansion techniques, although an attractive strategy, will likely face safety issues [7]. Alternatively, some have tried to increase homing by inhibiting a specific peptidase (CD26) responsible for the truncation and inactivation of SDF-1 α [8,9]. Others have looked into injecting HSC directly into the iliac crest as a way to circumvent the need for homing [10,11]. The results from these approaches, most of which are currently being tested in phase I/II clinical trials, are thus far either not available or disappointing [12].

Further studies have investigated the co-transplantation of bone marrow derived stromal cells (often referred to as MSC) together with hematopoietic cells to improve homing and engraftment [13-15]. This idea stems from the generally accepted concept that exposure to conditioning drugs (i.e. ionizing radiation (IR) and/or busulfan) damages the stromal microenvironment, preventing adequate homing and retention of the injected HSC [16]. While the co-transplantation of stromal cells was shown to be safe in humans, it was not shown to promote homing/engraftment convincingly. This is in contrast to previous work done in mouse models where co-transplantation of stromal cells was showed to be beneficial [17-19]. Altogether, these various approaches have in most cases only slightly improved homing and engraftment, suggesting that novel strategies need to be explored.

Intriguingly, the extent to which homing is reduced as a result of IR-induced damage to the microenvironment, and then restored by stromal cell therapy, is not known. Here, we report that homing is severely impaired following exposure to IR and that stromal cell therapy only partially restores this defect. Moreover, we identified an increase in the level of G-CSF in the marrow eluates of irradiated mice and provide evidence that expression of a soluble G-CSF decoy receptor is a novel approach to promoting homing.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Eight to 12 week-old female C57BL/6J mice were purchased from Charles River (Wilmington, MA). All mice were allowed to acclimate at least one week prior to their use for experimentation. All *in vivo* manipulations were approved by the Comité Institutionnel des Bonnes Pratiques Animales en Recherche of CHU Ste-Justine (protocol number S10-32).

Isolation, purification and characterization of mesenchymal stromal cells

Bone marrow was collected by flushing tibias, femurs and iliacs from C57BL/6J mice in phosphate buffer solution. Cleaned bones were next cut in small fragments of 1-2 mm and digested for 45 minutes with 0.25 % collagenase type 1 (Sigma, St Louis, MO). Bone marrow-derived stromal cells were isolated based on their property to attach to polystyrene following culture for 7 days in α -MEM containing 10 % fetal bovine serum and 1 % penicillin/streptomycin. Stromal population was then expanded for 2-4 passages (corresponding to 6-12 population doublings) in 3% oxygen and its phenotype confirmed by flow cytometry using the following antibodies: Ter119, CD31, CD45, CD44, CD90 and CD105, all purchased from BioLegend (San Diego, CA). Otherwise, fresh (non-cultured) bone marrow-derived stromal cells were isolated using the EasySep® negative selection kit for mesenchymal progenitors (StemCell Technologies, Vancouver, BC) from tibias and femurs of C57BL/6 mice. Procedure was followed as recommended by the manufacturer except that, 3 treatments of 0.25 % collagenase Type I solution were performed to improve cell recovery. Stromal cell purity was determined by flow cytometry using CD45 and Ter119 antibodies and evaluated at 80-90%.

Production of a soluble G-CSF decoy receptor

Full length and truncated sequences of the G-CSF receptor (G-CSFR) were amplified by PCR using the pCR Blunt II TOPO plasmid containing the full G-CSFR cDNA (purchased from OpenBiosystems, Huntsville, AL) as a template. PCR amplicons were cloned into pENTR1A destination plasmid (Invitrogen, Burlington, ON) and used to generate lentivectors (pLentiCMV/TO/G-CSFR and pLentiCMV/TO/solG-CSFR) using Gateway recombination technology (Invitrogen, Burlington, ON). The 3rd generation lentivector backbone was obtained from Dr. Eric Campeau (ericcampeau.com). Lentivirus production was performed using the standard method of transfection in 293T cells as previously described (Naldini et al #8602510). Finally, MSCs and 293T cells were transduced with lentivectors expressing the full and truncated forms of the G-CSFR. Their expression in MSCs and 293T cells was confirmed by western blot using G-CSFR antibody (# sc-9173, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Conditioned media

Conditioned media was collected from MSC, MSC/G-CSFR and MSC/solG-CSFR cultured at 80 % of confluence in 100 mm dish. Briefly, cells were first rinsed with phosphate-buffered saline twice and then transfer in serum-free media (α -MEM) for 72 hours. Conditioned media was collected and concentrated about 15 fold using Centricon® Plus-70 columns (Millipore, Billerica, MA) and conserved at 4°C until used. Where indicated, 250 μ l of concentrated conditioned media was injected intraperitoneally.

solG-CSFR decoy functionality assay

MSC expressing endogenous levels of the G-CSFR were cultured at 80 % confluence and starved in serum free media for 24 hours. Cells were then stimulated for 5 minutes with conditioned media collected from MSC or MSC secreting the solG-CSFR and supplemented with either 0, 0.2, 2 or 20 ng/ml G-

CSF. Cells were then washed with phosphate-buffered saline and resuspended in lysis buffer containing proteinase inhibitors. After incubation on ice for 30 minutes, lysates were cleared by centrifugation and supernatants collected for western blots analysis using ERK1/2 and pERK1/2 antibodies (# ab17942 and ab50011, Abcam, Cambridge, MA).

Homing

C57BL/6 mice were exposed or not to a unique sublethal dose of 8 Gy total body irradiation (using cobalt-60 as a source). One or five days post exposure to IR, 5×10^6 nucleated bone marrow cells stained according to the manufacturer instructions with 0.5 μ M carboxyfluorescein succinimidyl ester (Invitrogen, Burlington, ON) or 4 μ M PKH26 (Sigma, St. Louis, MO) were injected into the tail vein. 16 hours later, recipient mice were sacrificed and femoral bone marrow harvested for flow cytometry analysis of the absolute number or the proportion of labelled cells per femur using CountBright™ absolute counting beads (Invitrogen, Burlington, ON). Where indicated, marrow stromal cells purified as described above were also injected either intravenously (tail vein) or intraperitoneally prior to the injection of labelled hematopoietic cell.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the Graph Pad 5.0 software using unpaired Student *t* test and one-way ANOVA test. Results were considered statistically significant with *p* values < 0.05.

RESULTS

Exposure to IR reduces homing to the bone marrow of mice

Whether exposure to chemoradiotherapy benefits bone marrow transplantation by creating niche space and triggering the secretion of chemoattractive cytokines, such as SDF-1a, is controversial. To that effect, we used flow cytometry and absolute cell counts of fluorescently labelled hematopoietic cells to examine the impact of IR on homing. Our results clearly demonstrate that homing to the bone marrow of mice is severely compromised following exposure to IR (8 Gy), an effect we found was even more pronounced 5 days post-IR, when compared to 1 day post-IR ($p=0.0001$ vs $p=0.05$, Fig. 1a). These results (obtained using absolute cell counts) are in sharp contrast to what we observed looking at the proportion of labelled cells over the total number cells in the marrow (Fig. 1b), highlighting the importance of using the appropriate method to correctly assess homing. These data are in accordance with previous work by Collis and colleagues [20] and provide further evidence that the marrow niche is severely impaired post exposure to IR.

Injection of bone marrow stromal cells partially restores homing post exposure to IR

Alteration of the bone marrow stromal microenvironment has been proposed as a mechanism by which homing is reduced post-IR. This hypothesis is supported by data showing that injection of bone marrow stromal cells increases homing and/or engraftment in mice [17-19]. Yet, some of these reports have showed increased homing in situations where the niche had no time to regenerate, such as when stromal cells are injected simultaneously with hematopoietic cells [17,19]. These observations led us to wonder if the injection of stromal cells post-IR can restore homing to the level observed in the absence of irradiation, and whether it could even promote homing in a situation where the microenvironment had not been damaged.

We first determined the extent by which the injection of bone marrow stromal cells can increase homing in conditions where the recipient mice had been exposed or not to IR. To that effect, we used a population of fresh (uncultured) bone marrow-derived stromal cells obtained from collagenase-treated bone, phenotypically defined as CD45⁻ CD31⁻ CD44⁺ CD90^{dim}, and expressing osteoblast-specific genes (Fig. S1 and Carbonneau et al.). We chose to work with this stromal population given that we had previously determined it gets damaged following exposure to IR (Carbonneau et al.), as well as to obtain a sufficient number of cells without the need to expand them *in vitro*. Indeed, Rambout and Ploemacher showed that *in vitro* expansion of bone marrow stromal cells compromises their functions at the niche, an observation that has subsequently been confirmed by others [21-23].

Following exposure to IR, mice were injected intravenously with 5×10^4 purified stromal cells or PBS alone and then allowed a short (5 days) regeneration period before homing was evaluated (Fig. 2a). Using this protocol, we observed that the injection of stromal cells could increase homing by as much as 135% ($p = 0.01$) in mice exposed to IR (Fig. 2b). Surprisingly, injection of stromal cells using the same procedure was also found to modestly increase homing by 45% ($p = 0.05$) in non-irradiated mice (Fig. 2b). Overall, MSC have potential to increase homing of HSC to the bone marrow. This powerful potential is really interesting to use MSC as therapeutic agent.

Increased levels of G-CSF in the marrow of irradiated mice

Of high interest is also the observation that despite a very significant benefit from the injection of stromal cells in previously irradiated mice, homing was still approximately 3 fold lower than the baseline level observed in non-irradiated mice. This suggests that alternative strategies to stromal cell therapy need to be explored so as to restore homing. The profile of secreted cytokines within the bone marrow microenvironment is known to be modified in response

to IR; an example would be the increased expression of SDF-1a [4]. Among cytokines whose expression could negatively impact homing, G-CSF is certainly a strong candidate. Whether the level of G-CSF within the niche varies following exposure to IR, however, is not known. To answer this question, we measured by ELISA the level of G-CSF in the marrow eluate of irradiated and to non-irradiated mice femurs. Two days after irradiation, levels of G-CSF were increased by as much as 70% ($p=0.001$), an increase we found was transient given those levels returned to control values one week post-IR (Fig. 3 and data not shown). Quantitative real-time PCR analysis performed on purified marrow stromal and hematopoietic cells did not reveal any variation at the mRNA level, suggesting the absence of G-CSF transcriptional regulation (data not shown). Based on this finding, and given the potential of G-CSF as a mobilizing agent, we made the hypothesis that inhibition of G-CSF may have the potential to increase homing.

Expression of a G-CSF decoy receptor as a novel strategy to increase homing

One method by which inhibition of G-CSF could be achieved is through the expression of a soluble G-CSF decoy receptor (solG-CSFR), which if expressed at sufficiently high level, could sequester G-CSF. Accordingly, we have engineered a truncated version of the G-CSFR lacking 211 amino acids on the C-terminus corresponding to the transmembrane and intracellular domains (see Fig. 4a). Cloning of the full and truncated versions of the G-CSFR in lentiviral vectors confirmed their stable expression at the expected molecular weight (Fig. 4b). Importantly, the presence of the soluble receptor was only detected in the supernatant of cells transduced with the truncated form of the G-CSFR (latter referred as solG-CSFR, see Fig. 4b). The capacity of the solG-CSFR to sequester G-CSF was demonstrated *in vitro* by showing reduced ability of recombinant G-CSF to induce ERK1/2 phosphorylation in the presence of conditioned media (CM) containing the decoy receptor (Fig. 4c).

As a first attempt to sequester G-CSF systemic, we used cultured bone marrow derived stromal cells as a delivery vehicle to express the solG-CSFR in mice. We used an experimental protocol in which 15×10^6 stromal cells were injected intraperitoneally immediately after exposure of mice to IR and only one day before homing was determined (see Fig. 5a). We found the injection of stromal cells secreting the solG-CSFR to increase homing by as much as 90% when compared to mice who did not receive any cells (Fig. 5b). In comparison, injection of stromal cells alone conferred only a 37% increase in homing (Fig. 5b). The benefit from the secretion of the solG-CSFR was also reproduced using this time only CM collected from stromal cells secreting or not the decoy receptor. Using a protocol where 250 μ l of concentrated CM (15-fold, see methods) was injected intraperitoneally twice (1 and 16 hours before homing), we were able to confer a 35% increase in homing, an effect not observed using CM collected from non-transduced stromal cells (Fig. 5c). These results suggest that the solG-CSFR can favour homing independently of the action of stromal cells and could therefore represent a novel therapeutic strategy to be used alone or in combination with stromal cell therapy.

DISCUSSION

Homing of hematopoietic cells to the bone marrow microenvironment is a complex physiological process for which the cellular and molecular determinants are not fully understood. Here, we provide evidences that homing is severely impaired post exposure to IR, a phenotype that can be partially rescued by the injection of bone marrow stromal cells. Intriguingly, the injection of stromal cells could increase homing in both irradiated and non-irradiated mice, suggesting that one mechanism by which stromal cells benefit homing is independent of their expected role in regenerating the niche. How exactly the injection of stromal cells positively impact homing in absence of damage is not known, but may arise from an apparent increase in the size of the osteoblastic niche, which was showed to correlate with homing [24].

Our results also revealed that homing is still severely impaired in irradiated mice that received stromal cell therapy, an observation that may be explained in several ways. First, it is well known that exposure to IR leads not only to the apoptosis of hematopoietic cells but also to the destruction of the bone marrow vasculature [25], a phenotype that certainly prevents the proper distribution of cells injected intravenously. In that effect, we have tried preventing IR-induced damage by using pifithrin- α , an inhibitor of p53 who was showed to inhibit apoptosis in irradiated mice [26,27]. Unfortunately, the injection of pifithrin- α , at a dose reported to efficiently prevent apoptosis in mice, did not improve homing (as determined in absolute cells counts) in our model (data not shown). Whether the injection of pifithrin- α can efficiently preserves the bone marrow vascular network remains however to be determined.

Secondly, it is very likely that the amount of stromal cell injected in our model (5×10^4) is insufficient to fully restore homing. This limitation originates from the fact that we worked with a stromal cell population that had not been

previously expanded *in vitro* and thus for which only a very limited number of cells can be obtained. Indeed, the purification procedure we used only allowed a very limited number of stromal cells to be purified and labelled from one donor mouse (about $2\text{-}3 \times 10^4$ cells from collagenase treatment of long bones from tibias and femurs, see Fig. S1). Still, we believe that using non-cultured stromal cell populations is highly preferable given we found the injection of bone marrow stromal cells obtained following *in vitro* expansion (see Landry et al. [28]) had no beneficial impact on homing (data not shown). While it is difficult to compare expanded stromal cell populations with more heterogeneous freshly sorted cells, these results underline the importance of developing *in vitro* expansion protocols that would preserve the cellular functions and/or properties of marrow stromal cells [21-23]. Noteworthy, marrow stromal cells obtained following *in vitro* expansion could still modestly increase homing when injected intraperitoneally at a dose of 15×10^6 (Fig. 5b), suggesting these cells, albeit the large number injected, still retained some capacity in enhancing homing.

Looking for alternative strategies to restore homing post-IR, we made the observation that the level of G-CSF is increased in marrow eluates shortly after IR (Fig. 3). This increase was transient and did not appear to be transcriptionnaly regulated, suggesting that G-CSF may have been released in the marrow space from dying cells. We believe that an increase in the level of G-CSF post-IR could have a long-lasting impact on homing through for instance the known effects of G-CSF on osteoblasts homeostasis and the SDF-1 α /CXCR4 axis [5,29]. It is also worth mentioning that we also observed an increase in G-CSF levels in serum of aged (20 months) compared to young (3 months) mice (Fig. S2). Given it is well described that aged mice have a higher number of circulating HSC in blood compared to young mice [30], it is tempting to speculate that variations in the endogenous level of G-CSF may be sufficient to favour the egress of cells out of the marrow.

We also demonstrated that a soluble G-CSF decoy receptor can improve homing when delivered in mice using marrow stromal cell as a delivery vehicle or when injected directly in the form of conditioned media. The impact of our decoy receptor on homing was superior to the action of a G-CSF blocking antibody which, when injected at a dose of 10 μ g per mouse (a dose reported to inhibit the action of G-CSF in mice) [31] did not significantly increase homing (see Fig. S3). Unfortunately, it was not possible to increase engraftment following the injection of conditioned media containing the solG-CSFR (twice intraperitoneally as in our homing protocol, data not shown). Nonetheless, we believe the experimental conditions used in our study may be further optimized by the future development of a purified recombinant version of the G-CSF decoy receptor, which could then be injected at a higher concentration and thus potentially have a greater impact on homing and engraftment. Also, the development of a recombinant decoy receptor with a greater affinity to G-CSF compared to the endogenous receptor may be advantageous.

In conclusion, our results demonstrate that homing is severely compromised in a time dependent manner following exposure to IR, a phenotype we think is currently overlooked in the clinic. We believe it may be beneficial to develop bone marrow transplantation protocols in which HSC are injected rapidly after exposure to IR. Our results also suggest that a better knowledge of cytokines released in the bone marrow microenvironment following IR-induced damage (such as G-CSF) could lead to the development of novel strategies improving homing.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Vimal Krishnan for his critical reading of the manuscript and Denise Carrier for her help with mice. This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) #MOP-102709 and the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) to C.M.B. B.B. has been supported by a student fellowship from the FRSQ, C.L.C. by a studentship from the CIHR, A.F. and C.M.B. have been supported, respectively, by a studentship from the Fondation des étoiles and a scientist award by the FRSQ.

CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURE

No financial interest/relationships with financial interest relating to the topic of this article have been declared.

REFERENCES

1. Rocha V, Broxmeyer HE. New approaches for improving engraftment after cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; **16**(1 Suppl): S126-32.
2. Jetmore A, Plett PA, Tong X, Wolber FM, Breese R, Abonour R *et al.* Homing efficiency, cell cycle kinetics, and survival of quiescent and cycling human CD34(+) cells transplanted into conditioned NOD/SCID recipients. *Blood* 2002; **99**(5): 1585-93.
3. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 1997; **185**(1): 111-20.
4. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J *et al.* Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 2000; **106**(11): 1331-9.
5. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L *et al.* G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002; **3**(7): 687-94.
6. Sato N, Sawada K, Takahashi TA, Mogi Y, Asano S, Koike T *et al.* A time course study for optimal harvest of peripheral blood progenitor cells by granulocyte colony-stimulating factor in healthy volunteers. *Exp Hematol* 1994; **22**(10): 973-8.

7. Boitano AE, Wang J, Romeo R, Bouchez LC, Parker AE, Sutton SE *et al.* Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 2010; **329**(5997): 1345-8.
8. Campbell TB, Hangoc G, Liu Y, Pollok K, Broxmeyer HE. Inhibition of CD26 in human cord blood CD34+ cells enhances their engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice. *Stem Cells Dev* 2007; **16**(3): 347-54.
9. Christopherson KW, Hangoc G, Mantel CR, Broxmeyer HE. Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science* 2004; **305**(5686): 1000-3.
10. Castello S, Podesta M, Menditto VG, Ibatici A, Pitto A, Figari O *et al.* Intra-bone marrow injection of bone marrow and cord blood cells: an alternative way of transplantation associated with a higher seeding efficiency. *Exp Hematol* 2004; **32**(8): 782-7.
11. Frassoni F, Gualandi F, Podesta M, Raiola AM, Ibatici A, Piaggio G *et al.* Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol* 2008; **9**(9): 831-9.
12. Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ, Defor TE, McKenna D, Chong SY *et al.* Intra-BM injection to enhance engraftment after myeloablative umbilical cord blood transplantation with two partially HLA-matched units. *Bone Marrow Transplant* 2009; **43**(12): 935-40.
13. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM *et al.* Cotransplantation of *ex vivo* expanded mesenchymal stem cells

accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2007; **110**(7): 2764-7.

14. Bernardo ME, Ball LM, Cometa AM, Roelofs H, Zecca M, Avanzini MA *et al.* Co-infusion of *ex vivo*-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2011; **46**(2): 200-7.
15. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI *et al.* Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; **18**(2): 307-16.
16. Bernardo ME, Cometa AM, Locatelli F. Mesenchymal stromal cells: a novel and effective strategy for facilitating engraftment and accelerating hematopoietic recovery after transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2011.
17. Chan SL, Choi M, Wnendt S, Kraus M, Teng E, Leong HF *et al.* Enhanced *in vivo* homing of uncultured and selectively amplified cord blood CD34+ cells by cotransplantation with cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Stem Cells* 2007; **25**(2): 529-36.
18. Nakao N, Nakayama T, Yahata T, Muguruma Y, Saito S, Miyata Y *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate hematopoiesis *in vitro* and *in vivo*: advantages over bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Pathol* 2010; **177**(2): 547-54.

19. Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA *et al.* Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2002; **30**(8): 870-8.
20. Collis SJ, Neutzel S, Thompson TL, Swartz MJ, Dillehay LE, Collector MI *et al.* Hematopoietic progenitor stem cell homing in mice lethally irradiated with ionizing radiation at differing dose rates. *Radiat Res* 2004; **162**(1): 48-55.
21. Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E *et al.* Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* 2009; **206**(11): 2483-96.
22. Rombouts WJ, Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 2003; **17**(1): 160-70.
23. Wang L, Liu Y, Kalajzic Z, Jiang X, Rowe DW. Heterogeneity of engrafted bone-lining cells after systemic and local transplantation. *Blood* 2005; **106**(10): 3650-7.
24. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003; **425**(6960): 841-6.

25. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)* 2005; **20**: 349-56.
26. Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV *et al.* A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 1999; **285**(5434): 1733-7.
27. Strom E, Sathe S, Komarov PG, Chernova OB, Pavlovska I, Shyshynova I *et al.* Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nat Chem Biol* 2006; **2**(9): 474-9.
28. Landry Y, Le O, Mace KA, Restivo TE, Beausejour CM. Secretion of SDF-1alpha by bone marrow-derived stromal cells enhances skin wound healing of C57BL/6 mice exposed to ionizing radiation. *J Cell Mol Med* 2010; **14**(6B): 1594-604.
29. Christopher MJ, Rao M, Liu F, Woloszynek JR, Link DC. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. *The Journal of experimental medicine* 2011; **208**(2): 251-60.
30. Morrison SJ, Wandycz AM, Akashi K, Globerson A, Weissman IL. The aging of hematopoietic stem cells. *Nature medicine* 1996; **2**(9): 1011-6.
31. Shojaei F, Wu X, Zhong C, Yu L, Liang XH, Yao J *et al.* Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis. *Nature* 2007; **450**(7171): 825-31.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Impaired homing to the bone marrow following exposure to IR.

(A) Absolute number and (B) proportion (average \pm SEM) of PKH26⁺ cells present in femurs whole bone marrow (WBM) of mice transplanted with 5×10^6 WBM PKH26⁺ cells and exposed (+) or not (-) to IR (8 Gy) 2 or 5 days prior to sacrifice. n=6-20-8-10 mice per group. Student *t* test **p*<0.05, *****p*<0.0001.

Figure 2: Injection of bone marrow stromal cells (MSC) partially restores homing post IR.

(A) Schematic of the experiment. Mice were exposed (+) or not (-) to IR (8 Gy) and were injected or not with 5×10^4 MSC. 5 days later, mice were transplanted with 5×10^6 WBM PKH26⁺ cells and sacrificed the day after. (B) Homing was determined by the absolute number of PKH26⁺ cells present in femurs whole bone marrow (WBM) of mice. n=8-6-12-10 mice per group (CTR (□) and MSC (■)). Student *t* test **p*<0.05, ***p*<0.01 (compared to CTR mice).

Figure 3: Increased level of G-CSF in the bone marrow following exposure to IR.

(A) ELISA analysis of G-CSF secreted in femur of mice exposed to IR (8 Gy) 2 days and 1 week prior to sacrifice, compared to CTR mice non-irradiated. n=18-12-10-10 mice per group. One-way ANOVA test ****p*<0.001.

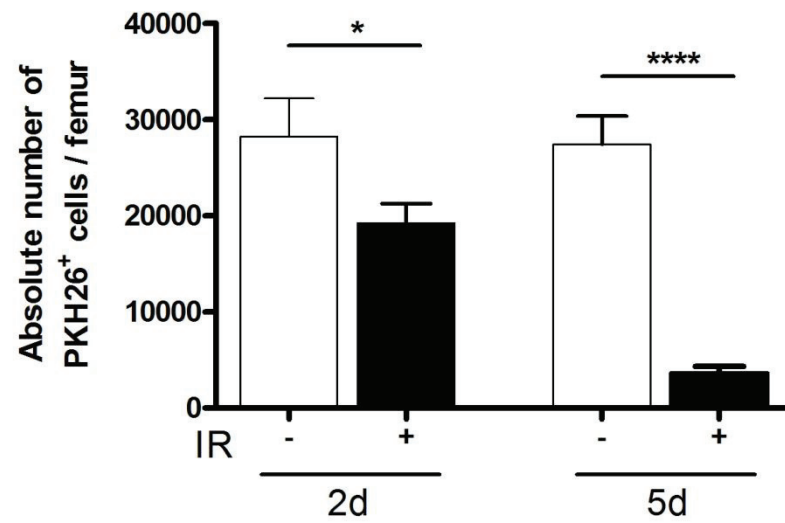
Figure 4: Generation of a secreted G-CSF decoy receptor.

(A) Schematic of the G-CSF receptor and G-CSF decoy receptor (lacking transmembrane and extracellular domains). (B) Western blot analysis of G-CSF receptor expression in cell lysates and conditioned media (CM) of 293T cells non-transfected (CTR), transfected with full length G-CSFR receptor (G-CSFR) or soluble G-CSF decoy receptor (solG-CSFR). (C) Western blot analysis of pERK1/2 and ERK1/2 expression in cell lysates of MSC stimulated with conditioned media of MSC or MSC/solG-CSFR and next supplemented either with 0, 0.2, 2 or 20 ng/ml G-CSF. Proportion of pERK inhibition by solG-CSFR decoy was

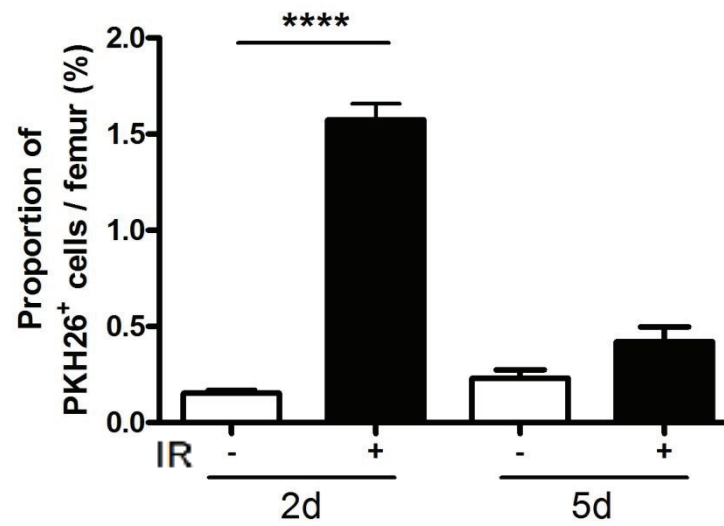
determined by band intensity comparison of cells stimulated with MSC/solG-CSFR versus MSC conditioned media, for each condition of G-CSF supplementation (Data were corrected with pERK/ERK ratio before inhibition analysis).

Figure 5: Injection of a soluble G-CSF decoy receptor as a tool to increased homing. (A) Schematic of the experiment. Mice were sublethally irradiated (8 Gy) and were injected intraperitoneally or not with 15×10^6 MSC or MSC/solG-CSFR. The day after, mice were transplanted with 5×10^6 WBM CFSE⁺ cells 1 day prior to sacrifice. (B) Homing was determined by absolute number of CFSE⁺ cells present in femurs whole bone marrow (WBM) of mice. n=6-12-15 mice per group. Expression of solG-CSFR decoy was demonstrated by western blot analysis of conditioned media secreted by MSC non-transfected (CTR), MSC transfected with G-CSF receptor (G-CSFR) or soluble G-CSFR (solG-CSFR). (C) Irradiated mice were injected or not with conditioned media of MSC or MSC/solG-CSFR, and were transplanted with 5×10^6 WBM CFSE⁺ cells the day after. Homing was determined by absolute number of CFSE⁺ cells present in femurs whole bone marrow (WBM) of mice 1 day following transplantation. n=9-7-10 mice per group. One-way ANOVA *p<0.05.

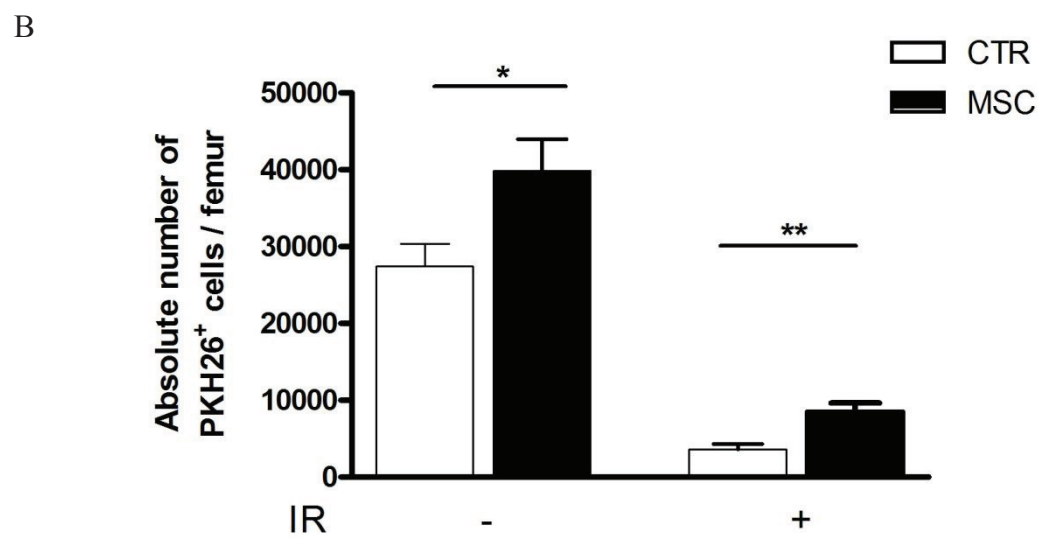
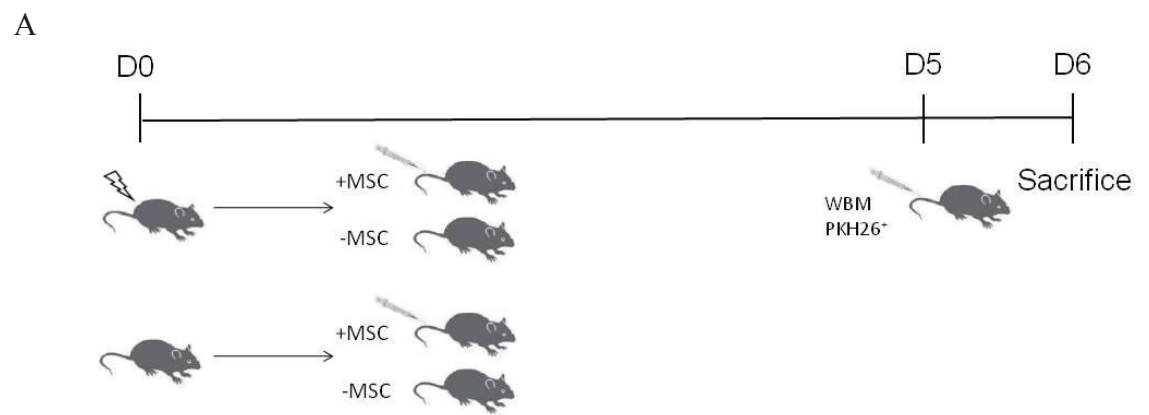
A



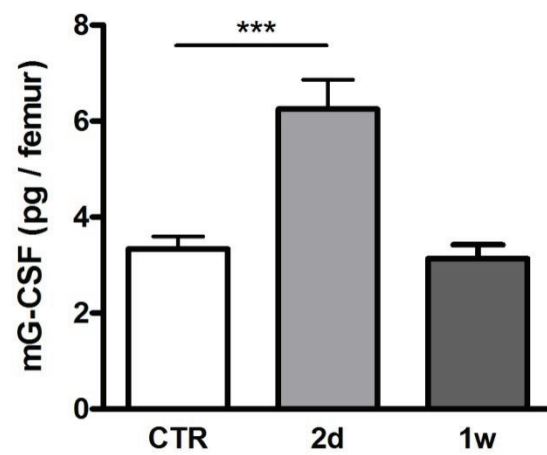
B



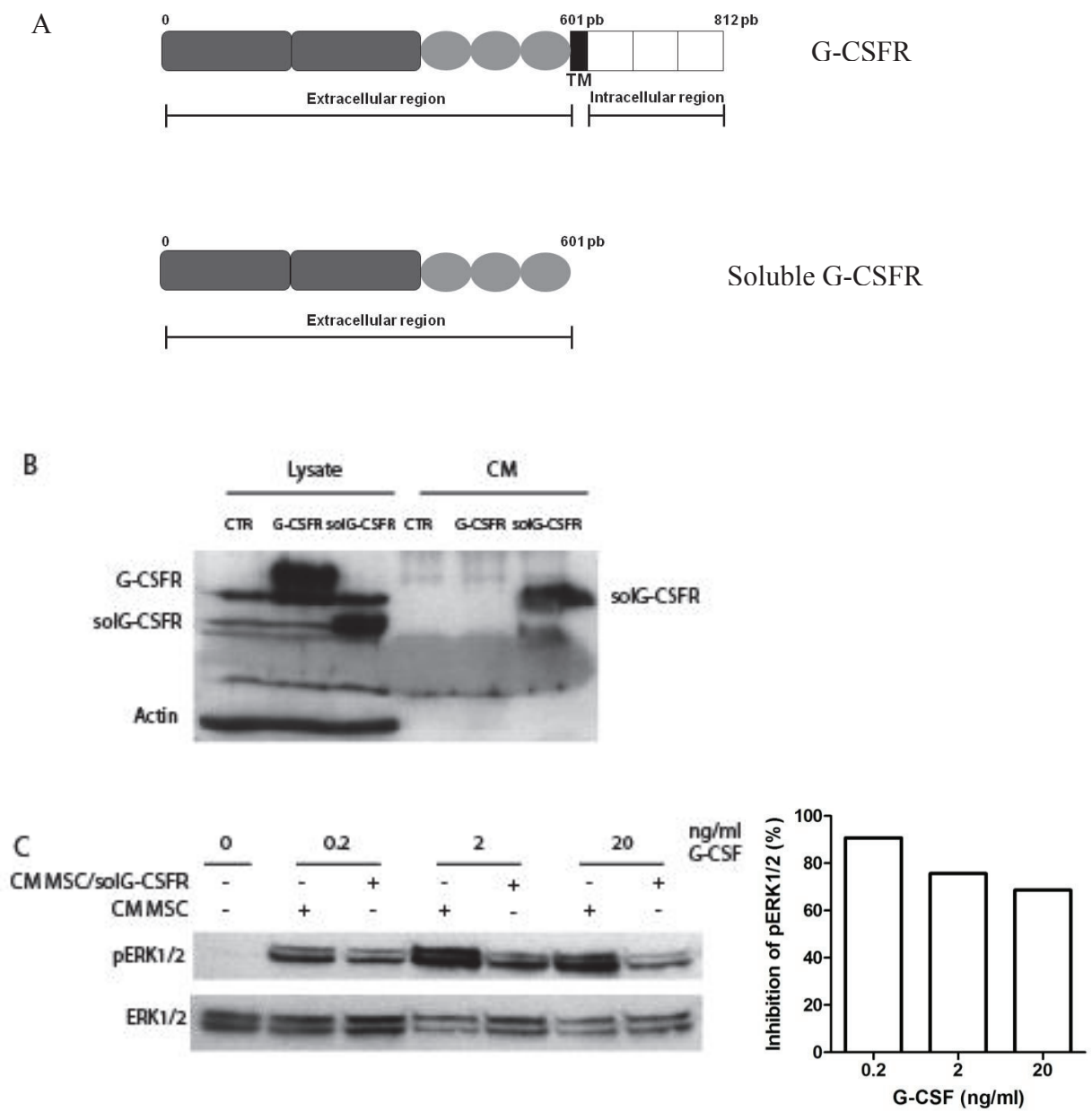
Fortin and al, Figure 1



Fortin and al, figure 2

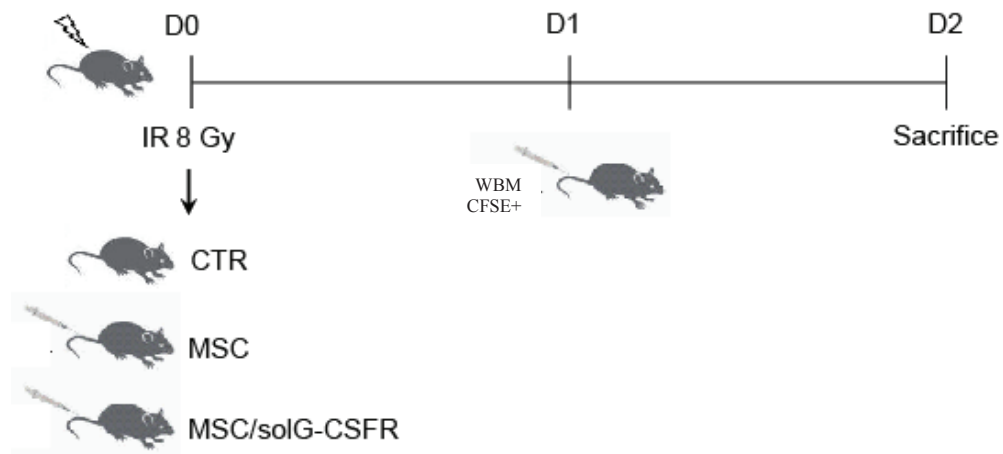


Fortin and al. Figure 3

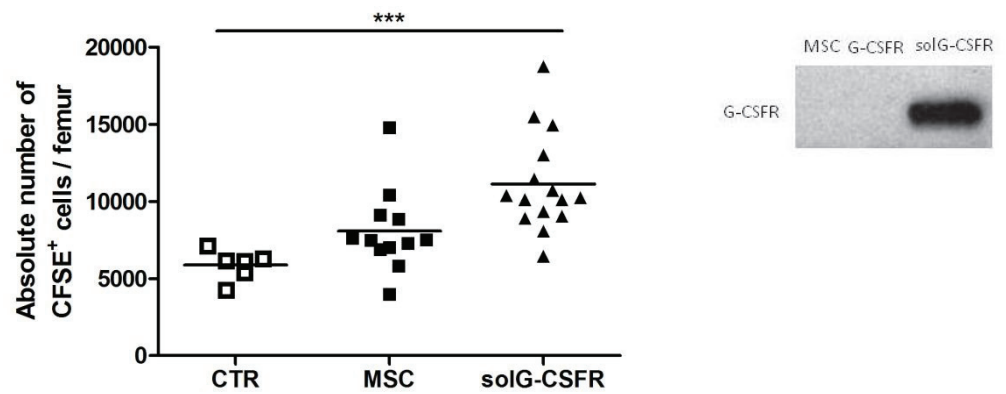


Fortin and al, figure 4

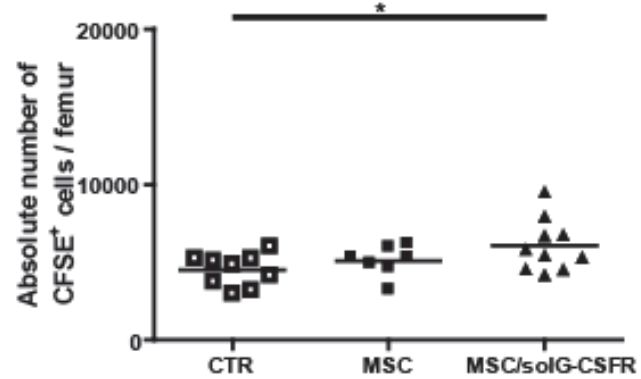
A



B



C



SUPPLEMENTARY MATERIAL

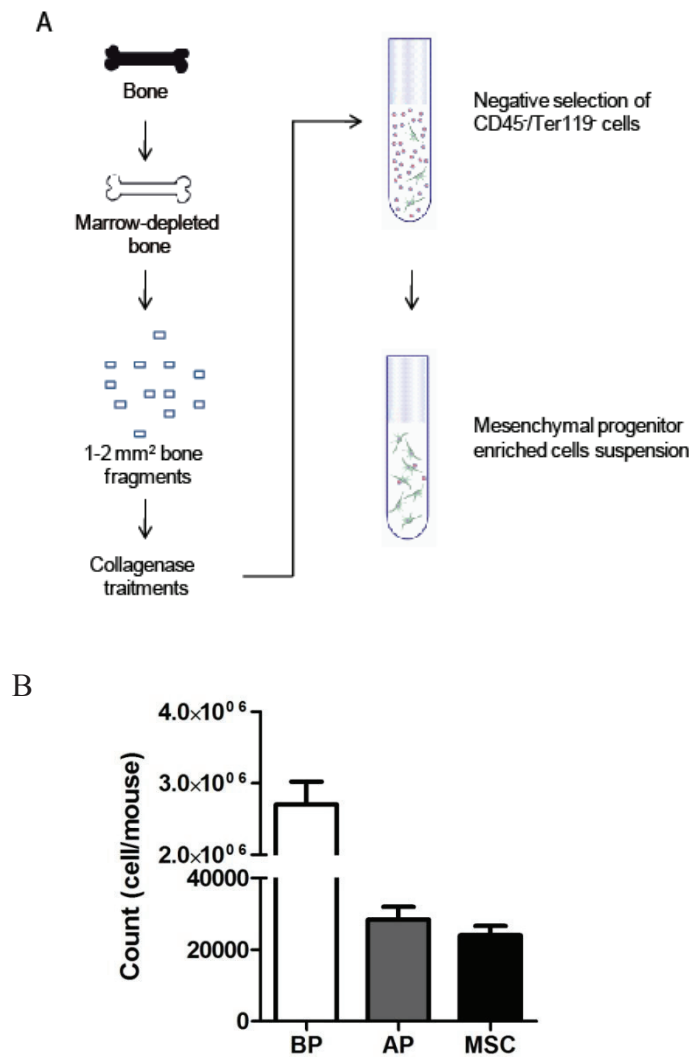


Figure S1: Isolation and purification of mouse mesenchymal progenitors.

A) EasySep® negative selection kit procedure for mesenchymal progenitors purification (StemCell Technologies, Vancouver, BC). B) Count of cells per mouse obtained from collagenase-treated bone before purification (BP) in comparison with the cell recovery after purification (AP) by negative selection of CD45⁺/Ter119⁺ cells and the purity of bone marrow-derived stromal cells (MSC) determined by flow cytometry using CD45 and Ter119 antibodies (BioLegend, SanDiego, CA).

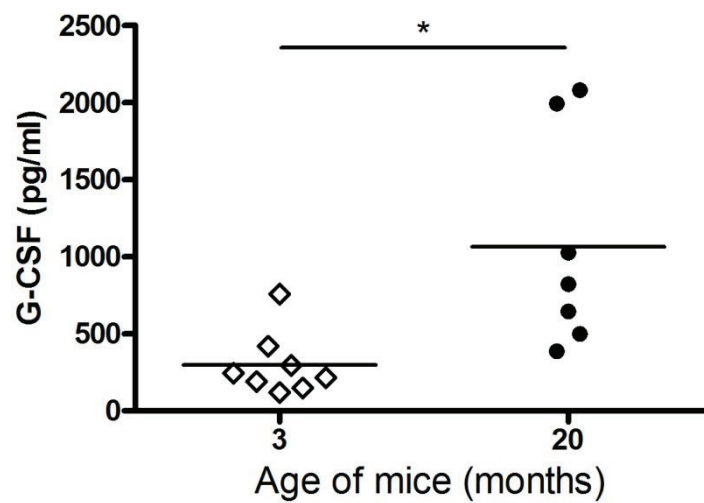


Figure S2: Increased level of G-CSF in serum of mice without exposure to IR. ELISA analysis of G-CSF secreted in serum of mice aged (20 months) compared to young (3 months) mice. n=8-7 mice per group. Student *t* test *p<0.05.

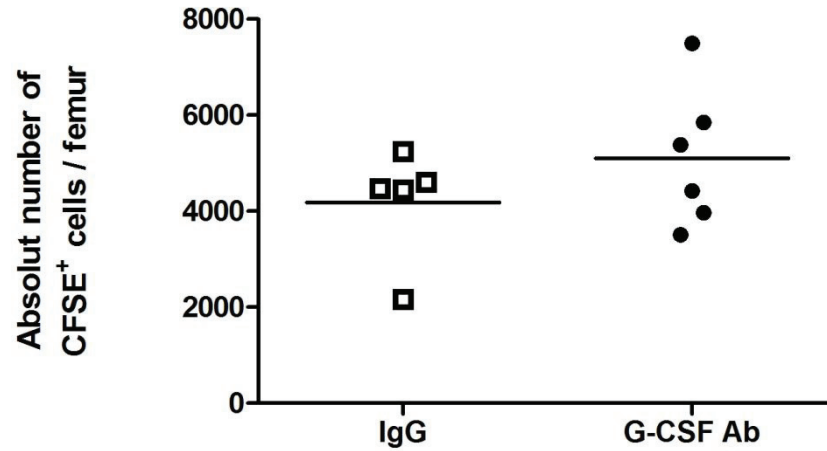


Figure S3: Injection of G-CSF antibody did not increased homing in irradiated mice model. C57BL/6 irradiated (8 Gy) mice were injected intraperitoneally with G-CSF antibody (#AF-414-NA, R&D Systems, Minneapolis, MN) or goat IgG (#G-202-C, R&D Systems, Minneapolis, MN) at a dose of 10 μ g per mouse prior to transplantation of 5×10^6 WBM CFSE⁺ cells. Mice were sacrificed the day after and homing was determined by the absolute number of CFSE⁺ cells present in femurs whole bone marrow (WBM) of mice. n=5-6 mice per group. Student *t* test **p*<0.05.

CHAPITRE VIII

8.1 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nos travaux ont permis d'apporter de nouvelles connaissances sur des nouvelles avenues thérapeutiques pouvant contrer les effets indésirables de la chimiothérapie et/ou de la radiothérapie chez les patients traités pour le cancer. Nous avons déterminé que le conditionnement par irradiation avait un impact limitant sur la prise de greffe hématopoïétique, plus précisément sur le nichage de cellules hématopoïétiques à la moelle osseuse.

Au cours de ce projet de recherche, nous avons d'abord déterminé si l'irradiation endommageait le microenvironnement osseux, ce qui pourrait expliquer les faibles taux de nichage hématopoïétique. Pour ce faire, nous avons comparé des groupes de souris irradiées ou non, et transplantées 2 ou 5 jours post-irradiation. Les résultats obtenus ont d'abord démontré que la méthode d'analyse de résultats de nichage par proportion (%) [208-210], c'est-à-dire, la quantité de cellules greffées dénombrées dans la moelle par rapport au nombre total de cellules dans la moelle, reflétait inadéquatement le nichage. En effet, ce calcul tient compte de la quantité totale de cellules dans la moelle, qui est diminuée après l'irradiation. Donc, pour un même nombre de cellules greffées ayant nichées, le résultat en pourcentage sera plus élevé dans une moelle irradiée comparativement à une moelle non-irradiée. Des études précédentes, utilisant la méthode par proportion, laissaient croire que l'irradiation serait bénéfique au nichage hématopoïétique, sous l'hypothèse que l'irradiation détruirait les cellules du microenvironnement osseux pour laisser la place aux cellules nouvellement transplantées [211]. Cependant, nous avons déterminé que l'approche permettant d'analyser le nichage en compte absolu reflétait

d'avantage la réalité. Cette technique permet de calculer la quantité de cellules ayant nichées à la moelle, sans tenir compte du nombre total de cellules dans la moelle. Nos résultats présentés ainsi, démontrent que l'irradiation est en fait néfaste au nichage hématopoïétique et que plus la période entre l'irradiation et la transplantation était longue, plus le dommage au microenvironnement était important, ce qui s'illustre par une diminution de la cellularité de la moelle osseuse.

Notre premier objectif était de déterminer si la régénération du microenvironnement osseux par une thérapie cellulaire à base de cellules stromales dérivées de la moelle pouvait faciliter la restauration de l'hématopoïèse. Par le fait même, nous avons voulu déterminer si un dommage à la moelle osseuse est nécessaire pour l'effet bénéfique de cette thérapie cellulaire sur le nichage hématopoïétique. Pour ce faire, nous avons d'abord démontré que l'injection de CSM améliorait le nichage hématopoïétique suite à l'irradiation. Les résultats s'expliquent par le fait que les CSM ont un effet bénéfique en régénérant la niche endommagée par l'irradiation. En effet, il est connu que les CSM peuvent migrer aux sites endommagés par irradiation [78-80] et qu'elles ont la capacité de s'y installer pour reformer le microenvironnement osseux et ainsi rétablir la fonction de la niche afin de favoriser le nichage hématopoïétique et le maintien des cellules hématopoïétiques à la moelle.

Ensuite, nous avons remarqué que les CSM ont un effet bénéfique sur le nichage hématopoïétique, sans même qu'il n'y ait de dommage relié à l'irradiation. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'en condition normale, le microenvironnement est constamment sujet à des dommages et que même si peu nombreux, ceux-ci peuvent avoir un impact limitant sur le nichage hématopoïétique. Nous pouvons alors supposer que leur correction par les CSM peut être un facteur améliorant le nichage hématopoïétique. Une autre

hypothèse est que les CSM sécrètent des cytokines chimioattractantes pour les CSH, ce qui aurait aussi pour effet d'améliorer leur nichage. Cependant, d'autres études devront être effectuées afin d'approfondir nos connaissances quant aux voies impliquées dans ce processus.

Même si la thérapie de CSM démontre une augmentation du nichage hématopoïétique suite à l'irradiation, cette technique laisse place à amélioration. En effet, les résultats démontrent que nous sommes loin d'avoir restauré les niveaux de nichage de base observés sans irradiation. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la quantité de CSM que nous avons injectée était trop faible. En raison de la technique d'isolation et purification des CSM fastidieuse et peu rentable, il était impensable d'en injecter davantage. En effet, cette procédure ne permet d'obtenir qu'un nombre limité de cellules purifiées d'environ $2-3 \times 10^4$ par souris. Comme des études montrent que la culture de CSM leur fait perdre certaines de leurs caractéristiques « souches » [204], l'utilisation de cellules fraîches, non-cultivées *in vitro*, est un facteur restreignant quant à la quantité que nous pouvons injecter lors de nos expérimentations. Cependant, afin d'obtenir de meilleurs résultats, il serait intéressant d'effectuer une thérapie avec un plus grand nombre de CSM afin de pouvoir déterminer si nous pouvons améliorer davantage le nichage hématopoïétique. Néanmoins, avec aussi peu de CSM, nous avons obtenu des résultats encourageants, ce qui démontre l'importance et l'efficacité des CSM au microenvironnement osseux.

D'autres essais devraient être effectués dans le but d'optimiser le modèle expérimental. En effet, nous avons supposé qu'une période de 5 jours était nécessaire et suffisante pour que les CSM injectées aient le temps de migrer à la niche osseuse et de régénérer le microenvironnement endommagé par l'irradiation. Cependant, si cette période est trop longue, la repopulation hématopoïétique se fera à partir des cellules hématopoïétiques de l'hôte au

détriment des cellules transplantées, ce qui va diminuer les résultats de nichage. Si cette période est trop courte, peut-être que nous n'obtenons qu'un aperçu partiel des capacités des CSM à améliorer le nichage hématopoïétique. Une mise au point de la période optimale entre l'injection de CSM et la greffe hématopoïétique devrait être effectuée afin d'obtenir de meilleurs rendements de nichage. Bien que plusieurs évidences laissent suggérer que l'efficacité de nichage hématopoïétique dépend du dommage au microenvironnement, il semble que la réparation de celui-ci par les CSM ne soit pas la seule stratégie pour améliorer le nichage hématopoïétique.

Au cours de ce projet de recherche, nous avons démontré que le niveau de la cytokine G-CSF était augmenté dans la moelle osseuse suite à l'irradiation. Comme le G-CSF est connu pour être un mobilisateur des CSH, nous croyons que l'augmentation de cette cytokine dans l'espace médullaire pourrait avoir un impact limitant sur le nichage des CSH. Notre objectif était donc de déterminer si le blocage transitoire du G-CSF pourrait améliorer le nichage hématopoïétique. Pour ce faire nous avons modifié génétiquement des CSM afin qu'elles surexpriment le récepteur soluble du G-CSF (solG-CSFR). Le but étant que le solG-CSFR soit sécrété par les CSM afin de séquestrer transitoirement le G-CSF circulant.

Nous avons d'abord vérifié la fonctionnalité *in vitro* du solG-CSFR en démontrant que cette molécule avait la capacité d'inhiber la signalisation du récepteur du G-CSF. En présence de la cytokine G-CSF, les cellules possédant son récepteur enclenchent une voie de signalisation, dont l'une des étapes est la phosphorylation de la protéine ERK1/2 [212]. À l'aide de CSM en culture, nous avons illustré par immunobuvardage qu'un conditionnement avec du solG-CSFR inhibait la formation de pERK1/2 en réponse à la stimulation par le G-CSF.

Ensuite, nous avons voulu déterminer l'effet d'une thérapie cellulaire bloquant le G-CSF par l'injection de CSM surexprimant le solG-CSFR (CSM/solG-CSFR) chez des souris irradiées avant la transplantation hématopoïétique. Les résultats démontrent une augmentation du nichage de 90 % lors de l'injection de CSM/solG-CSFR comparativement au groupe contrôle sans CSM, ce qui confirme notre hypothèse selon laquelle le G-CSF limiterait le nichage hématopoïétique.

Nous avons effectué une thérapie cellulaire à base de CSM modifiées génétiquement pour surexprimer le récepteur complet du G-CSF, à titre de contrôle. Les résultats observés démontrent aussi une augmentation du nichage (55 %) (données non présentées). Cela pourrait être dû au fait qu'en surexprimant le récepteur à leur surface, les CSM séquestrent suffisamment de G-CSF circulant, ce qui causerait un déséquilibre du niveau de cette cytokine et empêcherait partiellement son effet mobilisateur sur les CSH. Étonnamment, un contrôle où les souris ont été injectées avec des CSM non-modifiées génétiquement démontre une amélioration notable du nichage (37 %). Puisque les CSM expriment normalement la forme membranaire du récepteur du G-CSF, il se pourrait que cela empêche, mais de façon limitée, l'effet mobilisateur du G-CSF. De plus, le phénotype sécrétoire des CSM étant peu connu, il est fort probable que les CSM, par le biais d'autres molécules, pourraient améliorer le nichage des CSH. Cependant, d'autres études devront être effectuées afin de déterminer quelles sont les voies impliquées dans ce processus.

Malgré ces résultats encourageant, il y a encore place à optimisation, car nous sommes encore une fois loin de retrouver le niveau basal de nichage sans irradiation. Vu la quantité de cellules injectées, soit de 15×10^6 , il est peu concevable de vouloir améliorer la thérapie en augmentant le nombre de cellules. Cependant, il serait possible de modifier génétiquement les CSM afin qu'elles produisent davantage la protéine d'intérêt. De plus, d'autres essais

doivent être effectués en ce qui attrait au temps d'injection après irradiation. En effet, nous avons démontré *in vitro* les CSM/solG-CSFR produisait le solG-CSF, cependant nous n'avons pas démontré que cette molécule est synthétisée *in vivo* pour toute la période précédant la transplantation hématopoïétique. Il serait intéressant de refaire cette expérience avec différents temps d'injections de CSM/solG-CSFR afin d'évaluer la période optimale favorisant le nichage hématopoïétique.

Afin d'évaluer plus précisément le rendement du nichage hématopoïétique via le blocage du G-CSF et de contrer la problématique de la quantité de cellules pouvant être injectée chez la souris, nous avons reproduit le principe du modèle expérimental précédant en remplaçant l'injection de CSM par du milieu conditionné sécrété par celles-ci. Les résultats démontrent une différence significative d'amélioration du nichage hématopoïétique avec une thérapie de milieu conditionné de CSM/solG-CSFR comparativement au contrôle sans milieu conditionné. Néanmoins, cette approche confirme notre hypothèse selon laquelle le G-CSF a un impact limitant sur le nichage hématopoïétique. Cependant, contrairement au modèle précédent, la thérapie à base de milieu conditionné de CSM non-modifiées génétiquement n'améliore pas de façon significative le nichage des CSH à la moelle osseuse. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les récepteurs du G-CSF exprimés en surface des CSM sont absents dans le milieu conditionné sécrété par celles-ci et n'ont donc aucun impact sur le nichage hématopoïétique.

Encore une fois, il y a place à optimisation. Avec l'utilisation de milieu conditionné, il y a une augmentation du nichage de 35 % comparativement à 90 % pour la thérapie cellulaire de CSM/solG-CSFR. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait qu'on ne connaît pas le temps de demi-vie du récepteur soluble, ni son affinité et la durée d'interaction ligand récepteur. Il serait intéressant de créer une molécule plus stable en fusionnant par exemple une

partie Fc d'immunoglobuline et de vérifier si cela améliore l'effet bénéfique sur le nichage [213]. Aussi, vu que la quantité de cellules injectées est énorme, l'effet des récepteurs membranaires séquestrant le G-CSF s'additionne à l'effet anti-G-CSF procuré par le récepteur soluble sécrété. De plus, le nichage moins élevé avec l'injection de milieu conditionné pourrait être dû au fait que le milieu conditionné injecté représente une quantité moindre de solG-CSFR comparativement à la quantité sécrétés par les CSM *in vivo*. Il serait alors intéressant de répéter cette expérience avec différents temps et quantité d'injection de milieu conditionné

Finalement, comme le but de mon projet de maîtrise était d'améliorer la prise de greffe hématopoïétique, nous avons voulu déterminer si l'amélioration du nichage se traduisait à long terme par une meilleure prise de greffe. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle murin NOG [214], auquel nous avons transplanté des CSH humaines exprimant le CD34⁺. Nous avons voulu déterminer si la thérapie bloquant l'effet mobilisateur du G-CSF via l'injection de milieu conditionné contenant du solG-CSFR était bénéfique à la prise de greffe. Il a déjà été démontré que le G-CSF murin agissait sur le G-CSFR humain [215]. Malheureusement, les résultats supplémentaires ajoutés en annexe de ce mémoire (voir figure A1.1) démontrent que la prise de greffe 6 semaines post-transplantation n'est pas améliorée.

Pour cette expérience, la quantité de cellules CD34⁺ transplantées a été évaluée de façon à accorder une prise de greffe limitée, permettant de facilement observer s'il y a ou non amélioration suite à la thérapie. Ces résultats pourraient alors s'expliquer soit par un mauvais dosage du milieu conditionné de CSM/sol-G-CSFR injecté, soit par des temps d'injections non-optimaux. Sinon, ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que nous avons transplanté des cellules humaines dans un modèle murin. Des études ont démontré que la mobilisation de cellules murines dans un modèle murin était induite par le G-

CSF [216], de même que des cellules humaines dans un modèle humain [152, 217, 218]. Cependant, rien n'indique que le G-CSF murin a un effet mobilisateur sur les CSH humaines dans un modèle murin.

Donc, avant d'affirmer que les données précédentes contredisent notre hypothèse, nous avons répété cette expérience dans un modèle murin (voir les résultats supplémentaires en A1.2). Les résultats laissent croire que la prise de greffe est améliorée grâce à la thérapie à base de milieu conditionné de MSC/solG-CSFR. Cependant, l'impact à long terme de cette thérapie sur la prise de greffe devra être confirmé en effectuant d'autres essais afin d'être confiant de nos résultats.

CHAPITRE IX

9.1 CONCLUSION

En résumé, les résultats présentés dans ce mémoire apportent de considérables connaissances quant aux nouvelles avenues thérapeutiques pouvant améliorer la prise de greffe hématopoïétique. Plus précisément, nos travaux ont permis de déterminer que le conditionnement par irradiation endommageait le microenvironnement osseux au niveau cellulaire et au niveau de l'équilibre de la cytokine G-CSF. Nous avons d'abord démontré qu'une thérapie cellulaire à base de CSM pouvait partiellement corriger les dommages cellulaires du microenvironnement osseux, ce qui améliorait le nichage hématopoïétique. De plus, nous avons démontré qu'une thérapie bloquant le G-CSF via l'injection de CSM modifiées génétiquement surexprimant le solG-CSFR ou l'injection du milieu conditionné sécrété par celle-ci, limitait la mobilisation des cellules transplantées, ce qui favoriserait le nichage hématopoïétique. À long terme, tout porte à croire que ces thérapies de CSM ou de bloqueur du G-CSF pourraient améliorer la prise de greffe hématopoïétique et ainsi favoriser la survie et le rétablissement des patients traités contre le cancer.

BIBLIOGRAPHIE

1. Société canadienne du cancer, *Le cancer au Québec et au Canada: les faits en brefs*. 2011.
2. Holyoake TL, Nicolini FE et Eaves CJ, *Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood, and adult marrow*. Exp Hematol., 1999. **27**: p. 1418-1427.
3. Wang JC, Doedens M, Dick JE, *Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay*. Blood, 1997. **89**: p. 3919-3924.
4. Lord BI, Woolford LB et Wood LM, *Mobilization of early hematopoietic progenitor cells with BB-1000: A genetically engineered variant of human macrophage inflammatory protein-1 alpha*. Blood, 1995. **85**: p. 3412-3415.
5. Trentin JJ, *Influence of hematopoietic organ stroma (hematopoietic inductive microenvironments) on stem cell differentiation*. In: Gordon A, ed. Regulation of Hematopoiesis, New York: Appleton-Century-Crafts, 1970. **8**: p. 469-500.
6. Wolf NS, *The haematopoietic microenvironment*. Clinical haematology, 1979. **8**: p. 469-500.
7. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H et al., *Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: Implications for gene therapy*. Nat med, 1996. **2**: p. 1329-1337.
8. Peled A, Petit I, Kollet O et al., *Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of nOD/SCID mice on CXCR4*. Science, 1999. **283**: p. 845-848.
9. Kollet O, Petit I, Kahn J et al., *Human CD34(+)CXCR4(-) sorted cells harbor intracellular CXCR4, which can be functionally expressed and provide NOD/SCID repopulation*. Blood, 2002. **100**: p. 2778-2786.
10. Coleman CN, Stone HB, Moulder JE, Mededine Pellmar TC, *Modulation of radiation injury*. Science, 2004. **304**: p. 693-6394.
11. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A et al., *Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors*. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. N Engl J Med, 1997. **337**: p. 373-381.

12. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A et al., *Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors*. N Engl J Med, 1998. **339**: p. 1565-1577.
13. Blazar BR, Murphy WJ, *Bone marrow transplantation and approaches to avoid graft-versus-host disease (GVHD)*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005. **360**: p. 1747-1767.
14. Welniak LA, Blazar BR et Murphy WJ, *Immunology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Annu Rev Immunol., 2007. **25**: p. 139-170.
15. Antin JH et Ferrara G, *Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease*. Blood, 1992. **80**: p. 2964-2968.
16. Gluckman E et Rocha T, *Cord blood transplantation : state of the art*. Haematologica, 2009. **94**(4): p. 451-454.
17. Mohty M, *Dendritic cells and acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation*. Leuk Lymphoma, 2007. **48**: p. 1696-1701.
18. Nachbaur D et Kircher B, *Dendritic cells in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation* Leuk Lymphoma, 2005. **46**: p. 1387-1396.
19. Duffner UA et al., *Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease*. J Immunol., 2004. **172**: p. 7393-7398.
20. Billingham RE, *The biology of graft-versus-host reactions*. Harvey Lect, 1966. **62**: p. 21-78.
21. Levine JE, Blazar BR, DeFor T, Ferrara JL et Weisdorf DJ, *Long-term follow-up of a phase I/II randomized, placebo-controlled trial of palifermin to prevent graft-versus-host disease (GVHD) after related donor allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT)*. Biol. Blood Marrow Transplant., 2008. **14**: p. 1017-1021.
22. Uberti JP, Ayash L, Ratanatharathorn V et al., *Pilot trial on the use of etanercept and methylprednisolone as primary treatment for acute graft-versus-host disease*. Biol. Blood Marrow Transplant., 2005. **11**: p. 680-687.
23. Chakraverty R, Flutter B, Fallah-Arani F et al., *The host environment regulates the function of CD8+ graft-versus-host reactive effector cells*. J Immunol., 2008. **181**: p. 6820-6828.
24. Vodanovic-Jankovic S, Hari P, Jacobs P, Komorowski R et Drobyski WR, *NF-kB as a target for the prevention of graft-versus-host disease: comparative efficacy of bortezomib and PS-1145*. Blood, 2006. **107**: p. 827-834.

25. Chakraverty R, Cote D, Buchli J et al., *An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues*. J Exp Med, 2006. **203**: p. 2021-2031.
26. Ferrara JL et Reddy P, *Pathophysiology of graft-versus-host disease*. Semin. Hematol., 2006. **43**: p. 3-10.
27. Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E et al., *Natural killer cell alloreactivity and haplo-identical hematopoietic transplantation*. Cytotherapy, 2006. **8**: p. 554-558.
28. Ferrara JL, *Advances in the clinical management of GVHD*. Best Pract. Res. Clin. Hematol., 2008. **21**: p. 677-682.
29. Szabolcs P, *The immunobiology of cord blood transplantation*. Korean J Hematol., 2010. **45**(4): p. 224-235.
30. Rocha V, Gluckman E et Eurocord and European Blood and Marrow Transplant Group, *Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells*. Biol Blood Marrow Transplant., 2006. **12**: p. 34-41.
31. Rocha V, Labopin M, Sanz G et al., *Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia*. N Engl J Med, 2004. **351**: p. 2276-2285.
32. Kurtzberg J, Cater SL, Baxter-Lowe LA et al., *Results of the cord blood transplantation study (COBLT): Clinical outcomes of 193 unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with malignant conditions*. Biol Blood Marrow Transplant., 2005. **11**.
33. Mohty M et Apperley JF, *Long-term physiological side effects after allogeneic bone marrow transplantation*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2010: p. 229-236.
34. Thomas ED, Buckner CD, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE et al., *Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission*. N Engl J Med, 1979. **301**: p. 597-599.
35. Peffault de Latour R, Cabrespine-Faugeras A et Bay JO, *Évolution des conditionnements des greffes allogéniques de cellules souches hématopoïétiques chez l'adulte depuis 10 ans*. Bull Cancer, 2008. **95**(1): p. 87-97.
36. Brockhurst B, *Radiation damage in DNA (possible role of higher triplet states)*. Radiat. Res, 2001. **155**: p. 637.
37. Mothersill C et Seymour C, *Radiation-induced bystander effects (past history and future directions)*. Radiat. Res, 2001. **155**: p. 759.
38. Khodarev NN, Sokolova IA et Vaughan ATM, *Mechanisms of induction of apoptotic DNA fragmentation*. Int. J. Radiat. Biol., 1997. **73**: p. 455.

39. Blank KR, Rudoltz MS, Kao GD, Muschel RJ et Gillies-McKenna W, *The molecular regulation of apoptosis and implications for radiation oncology*. Int. J. Radiat. Biol., 1997. **71**: p. 455.
40. Terasima T et Tolmach LJ, *X-ray sensitivity and DNA synthesis in synchronous population of HeLa cells*. Science, 1963. **140**: p. 490-492.
41. Sinclair WK et Morton RA, *X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells*. Radiat. Res, 1966. **29**: p. 450-474.
42. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F et al., *Reversal of human cellular senescence: role of the p52 and p16 pathways*. EMBO J, 2003. **22**: p. 4212-4222.
43. Freitas AA, de Magalhaes JP, *A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing*. Mutat Res., 2011. **728**: p. 12-22.
44. Kohn KW, *Beyond DNA crossing-linking: history and prospects of DNA-targeted cancer treatment-fifteenth*. Cancer Res, 1996. **56**: p. 5533-5546.
45. Hurley LH, *DNA and its associated processes as targets for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**: p. 188-200.
46. Matalon ST, Ornoy A, Lishner M, *Review of the potential effects of three commonly used antineoplastic and immunosuppressive drugs (cyclophosphamide, azathioprine, doxorubicin on the embryo and placenta)*. Reprod Toxicol., 2004. **18**(2): p. 219-230.
47. Scott RB, *Cancer chemotherapy-The first twenty-five years*. British Med Journal, 1970. **4**: p. 259-265.
48. Pazdur R, Wagman LD, Camphausen KA, Hoskins WJ, *Cancer management : A multidisciplinary approach*. Cancer Management Handbook, 2008. **11**.
49. Ortho Multicenter Transplant Study Group., *A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplant*. N Engl J Med, 1985. **313**: p. 337-342.
50. Vincenti F, *Current use and future trends in induction therapy*. Saudi J Kidney Dis Transplan, 2005. **16**(4): p. 506-513.
51. Fausel C, *Targeted chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure*. J Manag Care Pharm, 2007. **13**: p. 8-12.
52. Storb R, Raff FR, Appelbaum FR et al., Appelbaum FR et al., *What irradiation dose for DLA-identical canine marrow grafts?* Blood, 1988. **72**: p. 1300-1304.

53. Storb R, Raff FR, Appelbaum FR et al., *DLA-identical bone marrow grafts after low-dose total body irradiation: the effect of canine recombinant hematopoietic growth factors*. Blood, 1994. **84**: p. 3558-3566.
54. Yu C, Storb R, Mathey B et al., *DLA-identical bone marrow grafts after low-dose total body irradiation: effects of high-dose corticosteroids and cyclosporine on engraftment*. Blood, 1995. **86**: p. 4376-4381.
55. Storb R, Yu C, Wagner JL et al., *Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation*. Blood, 1997. **89**(8): p. 3048-3054.
56. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG et al., *Biology of hematopoietic stem cells and progenitors : implications for clinical application*. Annu Rev Immunol., 2003. **21**: p. 759-806.
57. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H et al., *Identification of hematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. **425**: p. 836-841.
58. Nilsson SK, Johnson HM et Coverdale JA, *Spatial localization of transplanted hematopoietic stem cells: interferences for the localization of stem cell niches*. Blood, 2001. **97**: p. 2293-2299.
59. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. **425**(841-846).
60. Nilsson SK et al., *Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size*. J Exp Med, 2005. **201**: p. 1781-1791.
61. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN, *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*. Exp Hematol., 1976. **4**: p. 267-274.
62. Becker AJ, McCulloch EA et Till JE, *Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells*. Nature, 1963. **197**(4866): p. 452-454.
63. Siminovitch L, McCulloch EA et Till JE, *The distribution of colony-forming cells among spleen colonies*. Journal of Cellular and Comparative Physiology, 1963. **62**(3): p. 327-336.
64. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al., *Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method*. Exp Hematol. , 1974. **2**: p. 83-92.
65. Rochefort GY, Vaudin P, Bonnet N, Pages N, Domenech J, Charbord P et Eder V, *Influence of hypoxia on the domiciliation of mesenchymal*

- stem cells after infusion into rats: possibilities of targeting pulmonary artery remodeling via cells therapies?* Respiratory research, 2005. **6**(125).
66. da Silva ML, Chasgastelles PC et Nardi NB, *Mesenchymal stem cells reside in virtually post-natal organs and tissue*. J. Cell Sci., 2006. **199**: p. 2204-2213.
 67. Kern S, Eichler H, stoeve J, Klüter H et Bieback K, *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. Stem Cells, 2006. **24**: p. 1294-1301.
 68. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, et al., *Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells*. Transfusion, 2007. **47**: p. 1436-1446.
 69. Müller I, Kordowich S, Spano C, Isensee G, Staiber A, Veibahn S, Gieseke F, Langer H, Horwitz EM, Conte P, Handgretinger R et Dominici M, *Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM*. Cytotherapy, 2006. **8**(5): p. 437-444.
 70. Soncini M, Vertua E, Gibelli L et al., *Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes*. Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine, 2007. **1**: p. 296-305.
 71. Hou L, Cao H, Wang D, et al., *Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro*. International Journal of Hematology, 2003. **78**: p. 256-261.
 72. Yang XS, Wu HX et Xiao B., *Human mesenchymal stem cells differentiate into neuron-like cells and show SMN protein expression*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2005. **85**: p. 1125-1128.
 73. Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P, et al., *Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo*. Gut, 2009. **58**: p. 570-581.
 74. Aggarwal S, Pittenger MF, *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*. Blood, 2005. **105**: p. 1815-1822.
 75. Ankrum J, Karp JM, *Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back*. Mol. Med., 2010. **16**: p. 203-209.
 76. Murphy A, Cancedda R et Quarto R, *Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model*. Nat. Immunol., 2000. **11**: p. 674-680.
 77. Mahmood A, Lu D, Lu M et Choop M, *Treatment of traumatic brain injury in adult rats with in adult rats with intravenous asministration of human marrow stromal cells*. Neurosurgery, 2003. **53**(697-702).

78. Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, Frenkel J, Gregory C, Pochampally R, DiMattia G, Sullivan DE et Prockop DJ, *Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1*. Stem Cells, 2009. **27**: p. 670-681.
79. Chen L, Tredget EE, Wu PY et Wu Y, *Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing*. PLoS One 3, 2008. **e1886**.
80. Karp JM and Leng T, *Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details*. Cell Stem Cell, 2009. **4**: p. 206-216.
81. Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu CP, Kuroda Y, Kandeel F et Mullen Y, *Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation*. Exp. Hematol., 2009. **37**: p. 604-615.
82. Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos S, Gordon S, Kraus K, Smith A et Kadiyala S, *Allogenic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect*. J. Bone Joint Surg. Am., 2003. **85-A**: p. 1927-1935.
83. Li L et Xie T, *Stem cell niche: structure and function*. 2005. **21**: p. 605-631.
84. Spradling A, Drummond-Barbosa D et Kai T, *Stem cells find their niche*. Nature 2001. **414**: p. 98-104.
85. Lin H, *The stem-cell niche theory: lessons from flies*. Nat. Rev. Genet., 2002. **3**: p. 931-940.
86. Schofield R, *The relationship between the spleen colony-forming cell and the hematopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**: p. 7-25.
87. Muguruma Y et al., *Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment*. Blood, 2006. **107**: p. 1878-1887.
88. Lapidot T, Dar A et Kollet O, *How do stem cells find their way home?* Blood, 2005. **106**: p. 1901-1910.
89. Cancelas JA et Williams DA, *Stem cell mobilization by beta2-agonist*. Nat med, 2006. **12**: p. 278-279.
90. Devine MJ, Mierisch CM, Jang E, Anderson PC et Balian G, *Transplanted bone marrow cells localize to fracture callus in a mouse model*. J. Orthop. Res, 2002. **20**: p. 1232-1239.
91. Tong Yin et Linheng Li, *The stem cell niches in bone*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1995-1201.

92. Taichman RS, Reilly MJ et Emerson SG, *Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures*. Blood, 1996. **87**: p. 518-524.
93. Taichman R, Reilly M, Verma, R, Ehrenman K et Emmerson S, *Hepatocyte growth factor is secreted by osteoblasts and cooperatively permits the survival of haematopoietic progenitors*. Br. J. Haematol., 2001. **112**: p. 438-448.
94. Gong JK, *Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cell*. Science, 1978. **199**: p. 1443-1445.
95. Heissig B et al., *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand*. Cell, 2002. **109**(625-637).
96. Mishina Y, sttarbuck MW, Gentile MA, Fukuda T, Karparcova V, Seedor JG, Hnaks MC, Amling M, Pinero GJ et Dehninger RR, *Bone morphogenetic protein type IA receptor signaling regulates postnatal osteoblast function and bone remodeling*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27560-27566.
97. Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T et al., *c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation*. Genes Dev., 2004. **18**: p. 2747-2763.
98. Kamiya N, Ye L, Kobayashi T, Mochida Y, Yamauchi M, Kronenberg HM, Feng JQ et Mishina Y, *BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway*. Development, 2008. **135**: p. 3801-3811.
99. Murray TM, Rao LG, Divieti P et Brindhurst FR, *Parathyroid hormone secretion and action: Evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands*. Endocr Res, 2005. **26**(1).
100. Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, Yoon K, Cook MJ, Willert K, Gaiano N et Reya T, *Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance*. Nat Immunol., 2005. **6**: p. 314-322.
101. Visnjic D et al., *Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency*. Blood, 2004. **103**: p. 3258-3264.
102. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT et Rafii S, *The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization*. Physiology, 2005. **20**: p. 349-356.
103. Abkowitz JL, Robinson AE, Kale S, Long MW et Chen J, *Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure*. Blood, 2003. **102**: p. 1249-1253.

104. Avecilla ST et al., *Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis*. Nat med, 2004. **10**: p. 64-71.
105. Arai F et al., *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell niche quiescence in the bone marrow niche*. Cell, 2004. **118**: p. 149-161.
106. Adams GB et al., *Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor*. Nature, 2006. **439**: p. 599-603.
107. Driessen RL, Johnston HM et Nilsson SK, *Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region*. Exp Hematol., 2003. **31**: p. 1284-1291.
108. Nilsson SK et al., *Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells*. Blood, 2005. **106**: p. 1232-1239.
109. Papayannopoulou T, *Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization*. Blood, 2004. **103**: p. 1580-1585.
110. Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, Iizasa H, Bleul CC, Yoshie O et al., *Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14726-14729.
111. Shirozu M, N.T., Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T et Honjo T, *Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) gene*. Genomics, 1995. **28**: p. 495-500.
112. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T et Honjo T, *Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**: p. 2305-2309.
113. Bleul C, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J et al., *The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry*. Nature, 1996. **382**: p. 829-833.
114. Feng Y, Broder C, Kennedy P et Berger E, *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science, 1996. **272**: p. 872-277.
115. McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK et Palis J, *Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4*. Dev. Biol., 1999. **213**(2): p. 442-456.

116. Hodohara K, Fujiji N, Yamamoto N et Kaushansky K, *Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with thrombopoietin to enhance the development of megakaryocytic progenitor cells*. CBlood, 2000. **95**: p. 769-775.
117. Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, Rigal S, Jasmin C, Bourin P, Le-Bousse-Kerdiles MC, *Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34+ cells proliferation in synergy with cytokines: Possible role in progenitor survival*. Blood, 2000. **95**: p. 756-768.
118. Voermans C, Kooi MLK, Rodenhuis S, van-der-Lelie H, van-der-Shoot CE et Gerritsen WR, *In vitro migratory capacity of CD34+ cells in related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation*. Blood, 2001. **97**: p. 799-804.
119. Ara T, Itoi M, Kawabata K, Egawa T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Fujii N, Amagai T et Nagasawa T, *A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor 1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo*. J Immunol., 2003. **170**: p. 4649-4655.
120. Fassas A, Fox M, Calandra G et Tricot G, *Successful mobilization of peripheral blood stem cell (PBSCs) with ADM3100 in patients failing to collect with hematopoietic growth factors (HGF) and/or chemotherapy*. ASCO Meeting Abstract, 2004. **22**.
121. Zhong R, Law P, Wong D, Merzouk A, Salari H et Ball ED, *Small peptide analogs to stromal-derived factor 1 enhance chemotactic migration of human and mouse hematopoietic cells*. Exp Hematol., 2004. **32**: p. 470-475.
122. Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T et Honjo T, *Signaling sequence trap: A cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins*. Science, 1993. **261**: p. 600-603.
123. Peled A et al., *The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow*. J Clin Invest, 1999. **104**: p. 1199-1211.
124. Kortessid A et al., *Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells*. Blood, 2005. **105**: p. 3793-3801.
125. Imai K, Kobayashi M, Wang J, Ohiro Y, Hamada J, Cho Y et al., *Selective transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells: a role in homing of progenitor cells*. Blood, 1999. **93**(1): p. 149-156.
126. Petit I et al., *G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4*. Nat Immunol., 2002. **3**(7): p. 687-394.

127. Ponomaryov T, Peled I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J et al., *Increased production of SDF-1 following treatment with DNA damaging agents: relevance of human stem cell homing and repopulation of NOD/SCID mice.* J Clin Invest, 2000. **106**(11): p. 1331-1339.
128. Sun YX, Schneider A, Jung Y, Wang J, Dai J, Wang J et al., *Skeletal localization and neutralization of the SDF-1 (CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo.* J Bone Miner. Res., 2005. **2**: p. 318-329.
129. Katayama Y et al., *PSGL-1 participates in E-selectin-mediated progenitor homing to bone marrow: evidence for cooperation between E-selectin ligands and alpha4 integrin.* Blood, 2003. **102**: p. 2060-2067.
130. Yang FC et al., *Rac and Cdc42 GTPases control hematopoietic stem cell shape, adhesion, migration, and mobilization.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**: p. 5614-5618.
131. Larochelle A, Krouse A, Metzger M, Orlic D, Donahue RE, Fricker S, Bridger G, Dunbar CE et Hematti P, *ADM3100 mobilized hematopoietic stem cells with long-term repopulating capacity in non-human primates.* Blood, 2006.
132. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, et al., *Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist.* J. Exp. Med, 2005. **201**: p. 1307–1318.
133. Larochelle A, Krouse A, Metzger M, Orlic D, Donahue RE, Fricker S, Bridger G, Dunbar CE et Hematti P, *AMD3100 mobilizes hematopoietic stem cells with long-term repopulating capacity in nonhuman primates.* Blood, 2006. **107**: p. 3772–3778.
134. Wynn R, Hart C, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans C, Wraith J et al., *A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow.* Blood, 2004. **104**: p. 2643-2645.
135. Dar A, Goichberg P, Shinger V, Kalinkovich A, Kollet O, Netzer N et al., *Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells.* Nat Immunol., 2005. **6**: p. 1038-1046.
136. Kucia M, Ratajczak J, Reza R, Janowska-Wieczorek A et Ratajczak M, *Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury.* Blood Cells Mol Dis, 2004. **32**: p. 52-57.

137. Abbott J, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause D et Giordano F, *Stromal cell-derived factor 1a plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury*. Circulation, 2004. **110**: p. 3300-3305.
138. Ma J, Ge J, Zhang S, Sun A, shen J, Chen L et al., *Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously asministred bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction*. Basis Res Cardiol, 2005. **100**: p. 217-223.
139. Ji J, He B, Dheen S et Tay S, *Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration od mesenchymal stem cells to the impaired stie in the brain after hypoglossal nerve injury*. Stem Cells, 2004. **22**: p. 415-427.
140. Togel F, Isaax J, Hu Z, Weiss K et Wesenfelder C, *Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury*. Kidney Int, 2005. **67**: p. 1772-1784.
141. Ceradini D, Kulkarni A, Callaghan M, Tepper O, Bastidas N, Kleinman M et al., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients throughHIF-1 induction of SDF-1*. Nat med, 2004. **10**: p. 858-864.
142. Metcalf D, *The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors*. Science, 1985. **229**: p. 16-22.
143. Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki T, Yamamoto O, Hirata Y, Kubota N, Oheda M et Nomura H, *Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor*. Nature, 1986. **319**: p. 415-418.
144. Souza LM, Boone TC, Gabrilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, Chazin VR, Bruszewski J, Lu H, Chen KK, Barendt J, Platzer E, Moore MAS, Mertelsmann R et Welte K, *Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells*. Science, 1986. **232**: p. 61-65.
145. Liongue C, Wright C, Russell AP et Ward AC, *Granulocyte colony-stimulating factor receptor: Stimulating granulopoiesis and much more*. Int. J. Biochem. and Cell Biol., 2009. **41**: p. 2372-2375.
146. Touw IP et van de Geijn GJ, *Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal myeloid cell development, leukemia and related blood cell disorders*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 800-815.
147. O'Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, Stephenson SEM et Ward AC, *Cytokine receptor signaling through the Jak/Stat/Socs pathway in disease*. Mol Immunol, 2007. **44**: p. 2497-2506.

148. Metcalf D, *The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haematopoietic cells*. Nature, 1989. **339**.
149. Yuo A, Kitagawa S, Ohsaka A, Saito M et Takaku F, *Stimulation and priming of human neutrophils by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: quantitative differences*. Biochem. Biophys., 1990. **171**.
150. Shimoda K, Okamura S, Harada N, Okamura T et Niho Y, *Identification of a functional receptor for granulocyte colony-stimulating factor on platelets*. J Clin Invest, 1993. **91**.
151. Ward AC, *The role of the granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSFR-R) in disease*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 608-618.
152. Christopher MJ et Link DC, *Regulation of neutrophils homeostasis*. Curr Opin Hematol, 2007. **14**: p. 3-8.
153. Christopher MJ, Liu F, Hilton MJ, Long F et Link DC, *Suppression of CXCL12 production by bone marrow homeostasis in a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization*. Blood, 2009. **114**: p. 1331-1339.
154. Sung L et Dror Y, *Clinical applications of granulocyte-colony stimulating factor* Front Biosci, 2007. **12**: p. 1988-2002.
155. Schneider A, Krüger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, Hasselblatt M, Kollmar R, Schwab S, Sommer C, Bach A, Kuhn HG et Schäbitz WR, *The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2083-2098.
156. Pitzer C, Krüger C, Plaas C, Kirsch F, Dittgen T, Müller R, Laage R, Kastner S, Suess S, Spoelgen R, Henriques A, Ehrenreich H, Schäbitz WR, Bach A et Schneider A, *Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. Brain, 2008. **131**: p. 3335-3347.
157. Narumiya S, Sugimoto Y et Ushikubi F, *Prostanoid receptors: structures, properties, and functions*. Physiol Rev, 1999. **79**(4): p. 1193-1126.
158. Miller SB, *Prostaglandins in health and disease: an overview*. Semin Arthritis Rheum., 2006. **36**: p. 37-49.
159. Kurland JI, Bockman RS, Broxmeyer HE et Moore MA, *Limitation of excessive myelopoiesis by intrinsic modulation of macrophage-derived prostaglandin E*. Science, 1978. **199**: p. 552-555.

160. Kurland JI, Broxmeyer HE, Pelus LM, Mockman RS et Moore MA, *Role for monocyte-macrophage-derived colony-stimulating factor and prostaglandin E in the positive and negative feedback control of myeloid stem cell proliferation*. Blood, 1978. **52**(2): p. 388-407.
161. Taniguchi S, Shibuya T, Harada M et Niho Y, *Prostaglandin-mediated suppression of in vitro growth of erythroid progenitor cells*. Kidney Int, 1989. **36**(4): p. 712-718.
162. Vore SJ, Eling TE, Danilowicz M, Tucker AN et Luster MI, *Regulation of murine hematopoiesis by arachidonic acid metabolites*. Int J Immunopharmacol, 1989. **11**(5): p. 435-442.
163. O'Reilly M et Gamelli RL, *Indomethacin augments granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced hematopoiesis following 5-FU treatment*. Exp Hematol., 1990. **18**(9): p. 974-978.
164. Lu L, Pelus LM et Broxmeyer HE, *Modulation of the expression of HLA-DR (Ia) antigens and the proliferation of human erythroid (BFU-E) multipotential (CFU-GEMM) progenitor cells by prostaglandin E*. Exp Hematol., 1984. **12**(9): p. 741-748.
165. Pelus LM, Broxmeyer HE, Kurland JI et Moore MA, *Regulation of macrophage and granulocyte proliferation: specificities of prostaglandin E and lactoferrin*. J Exp Med, 1979. **150**: p. 277-292.
166. Pelus LM, Broxmeyer HE et Moore MA, *Regulation of human myelopoiesis by prostaglandin E and lactoferrin*. Cell Tissue Res, 1981. **14**: p. 515-526.
167. Gentile P, Byer D et Pelus LM, *In vivo modulation of murine myelopoiesis following intravenous administration of prostaglandin E₂*. Blood, 1983. **62**: p. 1100-1107.
168. Lu L, Pelus LM, Piacibello W et al., *Prostaglandin E acts at two levels to enhance colony formation in vitro by erythroid (BFU-E) progenitor cells*. Exp Hematol., 1987. **15**: p. 765-771.
169. Yoshida K, Oida H, Kobayashi T et al., *Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP₄ receptor activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4580-4585.
170. Chyun YS et Raisz LG, *Stimulation of bone formation by prostaglandin E₂*. prostaglandins, 1984. **27**(1): p. 97-103.
171. Jee WS, Ueno K, Deng YP et Woodbury DM, *The effects of prostaglandin E₂ in growing rats: increased metaphyseal hard tissue and cortico-endosteal bone formation*. Calcif Tissue Int, 1985. **37**(2): p. 148-157.

172. Jee WS, Ueno K, Kimmel DB, Woodbury DM, Price P et Woodbury LA, *The role of bone cells in increasing metaphyseal hard tissue in rapidly growing rats treated with prostaglandin E2*. Bone, 1987. **8**(3): p. 171-178.
173. Mori S, Jee WS, Li XJ, Chan S et Kimmel DB, *Effects of prostaglandin E2 on production of new cancellous bone in the axial skeleton of ovariectomized rats*. Bone, 1990. **11**(2): p. 103-113.
174. Jee WS, Ke HZ et Li XJ, *Long-term effects of prostaglandin-E2 on tibial diaphyseal bone in male rats*. Bone Miner, 1991. **15**(1): p. 33-55.
175. Yang RS, Liu TK et Lin-Shiau SY, *Increased bone growth by local prostaglandin E2 in rats*. Calcif Tissue Int, 1993. **52**(1): p. 57-61.
176. Weired M, Suponitzky I et Keila S, *Systemic administration of an anabolic dose of PGE2 in young rats increases the osteogenic capacity of bone marrow*. Bone, 1997. **20**(6): p. 521-526.
177. Rodan SB, Rodan GA, Simmons HA, Walenga RW, Feinstein MB et Raisz LG, *Bone resorptive factor produced by osteosarcoma cells with osteoblastic features is PGE2*. Biochem. Biophys Res Commun, 1981. **102**(4): p. 1358-1365.
178. Ono K, Kaneko H, Choudhary S et al., *Biphasic effect of prostaglandin E2 on osteoclast formation in spleen cell cultures: role of the EP2 receptor*. J Bone Miner. Res., 2005. **20**(1): p. 23-29.
179. Kobayashi Y, Mozoguchi T, Take I, Kurihara S, Udagawa N et Takahashi N, *Prostaglandin E2 enhances osteoclastic differentiation of precursor cells through protein kinase A-dependent phosphorylation of TAK1*. J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 11395-11403.
180. Take I, Kobayashi Y, Yamamoto Y et al., *Prostaglandin E2 strongly inhibits human osteoclast formation*. Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5204-5214.
181. Kaneko H, Mehrotra M, Alander C, Lerner U, Pilbeam C et Raisz L, *Effects of prostaglandin E2 and lipopolysaccharide on osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2007. **77**(3): p. 181-186.
182. Klein-Nulend J, Pilbeam CC, Harrison JR, Fall PM et Raisz LG, *Mechanism of regulation of prostaglandin production by parathyroid hormone, interleukin-1, and cortisol in cultured mouse parietal bones*. Endocrinology, 1991. **128**(5): p. 2503-2510.
183. Raisz LG et Simmons HA, *Effects of parathyroid hormone and cortisol on prostaglandin production bu neonatal rat calvaria in vitro*. Endocr Res, 1985. **11**(1): p. 59-74.

184. Kawaguchi H, Raisz LG, Vozzensensky OS, Alander CB, Hakeda Y et Pilbeam CC, *Regulation of the two prostaglandin G/H synthases by parathyroid hormone, interleukin-1, cortisol, and prostaglandin E2 in cultured neonatal mouse calvariae*. Endocrinology, 1994. **135**(3): p. 1157-1164.
185. Tetrais S, Pilbeam CC, Liu Y, Herschman HR et Kream BEE, *Parathyroid hormone incrcased prostaglandin G/H synthase-2 transcription by a cyclic adenosin 3',5'-monophosphate-mediated in murine osteocalstic MC3T3-E1 cells*. Endocrinology, 1997. **138**(9): p. 3594-3600.
186. Du X et Weng JY, *Safety and efficacy study of allogenic mesenchymal stem cells to treat extensive chronic graft versus host disease*. ClinicalTrials.gov, 2009.
187. Du X, *A Phase II, Randomized Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Ex-Vivo Cultured Allogenic Mesenchymal Stem Cells For the Treatment of Extensive Chronic Graft Versus Host Disease*. ClinicalTrials.gov, 2009.
188. Hillard M et Lazarus MD, *Donor Mesenchymal Stem Cell Infusion for Treatment of Graft Versus Host Disease: A Phase I Trial*. ClinicalTrials.gov, 2010.
189. Monroy R, *A Phase II, Randomized Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Prochymal (Ex-vivo Cultured Adult Human Mesenchymal Stem Cells) For the Treatment of aGVHD in Patients Who Receive Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. ClinicalTrials.gov, 2009.
190. Lee SH, *A Randomized, Open-label, Multicenter Trial for the Safety and Efficacy of Intracoronary Adult Human Mesenchymal Stem Cells After Acute Myocardial Infarction*. ClinicalTrials.gov, 2011.
191. Roncalli J, *Administration of Mesenchymal Stem Cells in Patients With Chronic Ischemic Cardiomyopathy*. ClinicalTrials.gov, 2011.
192. Kastrup J, *A Single Centre, Randomised Controlled Study of the Effect of NOGA-Guided Direct Intramyocardial Injection of Mesenchymal Stromal Cells on the Development of New Myocardium and Blood Vessels in Patients With Heart Failure*. ClinicalTrials.gov, 2008.
193. Wang FS, *Phase I/II Study of Human Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cells (UC-MSCs) for Treatment of Liver Failure*. ClinicalTrials.gov, 2010.
194. Allay JA, Dennis JE, Haynesworth SE, Majumdar MK, Clapp DW, Shultz LD, Caplan AI et Gerson SL, *LacZ and interleukin-3 expression in vivo after retroviral transduction of marrow-derived human*

- osteogenic mesenchymal progenitors*. Hum Gene Ther., 1997. **8**(12): p. 1417-14427.
195. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S et al., *Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo*. Exp Hematol., 2002. **30**: p. 42-48.
 196. Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA et al., *Mesenchymal stem cell promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice*. Exp Hematol., 2002. **30**: p. 870-878.
 197. Hiwase SD, Dyson PG, To LB et Lewis ID, *Cotransplantation of placental mesenchymal stromal cells enhances single and double cord engraftment in nonobese diabetic/severe immune deficient mice*. Stem cell, 2009. **27**: p. 2293-2300.
 198. Masuda S, Ageyama N, Shibata H, Obara Y, Ikeda T, Takeuchi K et al., *Cotransplantation with MSCs improves engraftment of HSCs after autologous intra-bone marrow transplantatio in nonhuman primates*. Exp Hematol., 2009. **37**: p. 1250-1257.
 199. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI et al., *Rapid hematopoietic recovery after co-infusion of autologous-blood stem cells in advanced breast cancer patients receiving hogh-dose chemotherapy*. J Clin Oncol, 2000. **18**: p. 307-316.
 200. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK et al., *Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients*. Biol. Blood Marrow Transplant., 2005. **11**: p. 389-398.
 201. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM et al., *Co-transplantation of ex-vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2007. **110**: p. 2764-2767.
 202. Gonzalo-Daganzo R, Regidor C, Martin-Donaire T, Rico MA, Bautista G, Krsnik I et al., *Results of a pilot study on the use of third-party mesenchymal stromal cells in cord blood transplantation in adults*. Cytotherapy, 2009. **11**: p. 278-288.
 203. Rombouts WJ et Ploemacher RE, *Primary murine MSC show highly homing to the bone marrow but lose homing ability following culture*. Leukemia, 2003. **17**(1): p. 160-170.

204. Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, Suzuki S, Miyauchi-Hara C, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Miyawaki A, Nakagawa T, Suda T, Okano H et Matsuzaki Y, *Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murin bone marrow*. J Exp Med, 2009. **206**(11): p. 2483-2496.
205. Cilloni D, CARl-Stella C, Falzetti F, Sammarelli G, Regazzi E, Colla S et al., *Limited engraftment capacity of bone marrow-derived mesenchymal cells following T-cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2000. **96**: p. 3637-3643.
206. Pozzi S, Lisini D, Podestà M, Bernardo ME, Sessarego N, Piaggio G et al., *Donor multipotent mesenchymal stromal cells may engraft in pediatric patients given either cord blood or bone marrow transplantation*. Exp Hematol., 2006. **34**: p. 934-942.
207. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M et al., *Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis omperfecta*. Nat med, 1999. **5**: p. 309-313.
208. Hart C, Drewel D, Mueller G, Grassinger J, Zaiss M, Kunk-Schughart LA, Andreesen R, Reichle A, Holler E et Hennemann B, *Expression and function of homing-essential molecules and enhanced in vivo homing ability of human peripheral blood-derived hematopoietic progenitor cells after stimulation with stem cell factor* Stem Cells, 2004. **22**: p. 580-589.
209. Spencer A, Jackson J et Baulch-Brown C, *Enumeration of bone marrow homing haematopoietic stem cell from G-CSF-mobilised normal donors and influence on engraftment following allogeneic transplantation* 2001 **28** (11): p. 1019-1022.
210. Oostendorp RAJ, Ghaffari S et Eaves CJ, *Kinetics of in vivo homing and recruitment into cycle of hematopoietic cells are organ-specific but CD44- independent* Bone Marrow Transplant. , 2000 **26** (5): p. 559-566
211. Gyurkocza B, Rezvani et Storb RF, *Allogeneic hematopoietic transplantation: the state of the art*. Expert Rev Hematol, 2010. **3**(3): p. 285-299.
212. Qiu Y, Zhuang D, MacRae A et Dong F, *The G-CSF receptor carboxyl terminus, truncated in AML/SCN, is required for induction of a Stat5 protease activity*. Leuk Res, 2005. **29**: p. 1153-1162.
213. Cao S, Wu C, Yang Y, Sniderhan LF, Maggirwar SB, Dewhurst S et Lu Y, *Lentiviral vector-mediated stable expression of sTNFR-Fc in human macrophage and neuronal cells as a potential therapy for neuroAIDS*. J Neuroinflammation, 2011. **8**.

214. Ito M et al., *NOD/SCID/ γ null mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells*. Blood, 2002. **100**(9): p. 3175-3182.
215. Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, Hattori F, Tanaka T, Hara M, Ohno Y, Chen H, Egasgira T, Seki T, Yae K, Koshinizu U, Ogawa S et Fukuda K, *G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs*. Cell Stem Cell, 2010. **6**: p. 227-237.
216. Abkowitz JL, Robinson AE, Kale S, Long MW et Chen J, *Mobilization of hematopoietic stem cells during hematopoiesis and after cytokine exposure*. Blood, 2003. **102**.
217. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fuji N, Zipori D, Lapidot T, *G-CSF induce stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4*. Nat Immunol., 2002. **3**: p. 687-694.
218. Pelus LM, Horwitz D, Cooper SC et King AG, *Peripheral blood stem cell mobilization. A role of CXC chemokines*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **43**: p. 257-275.

ANNEXE

A1. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

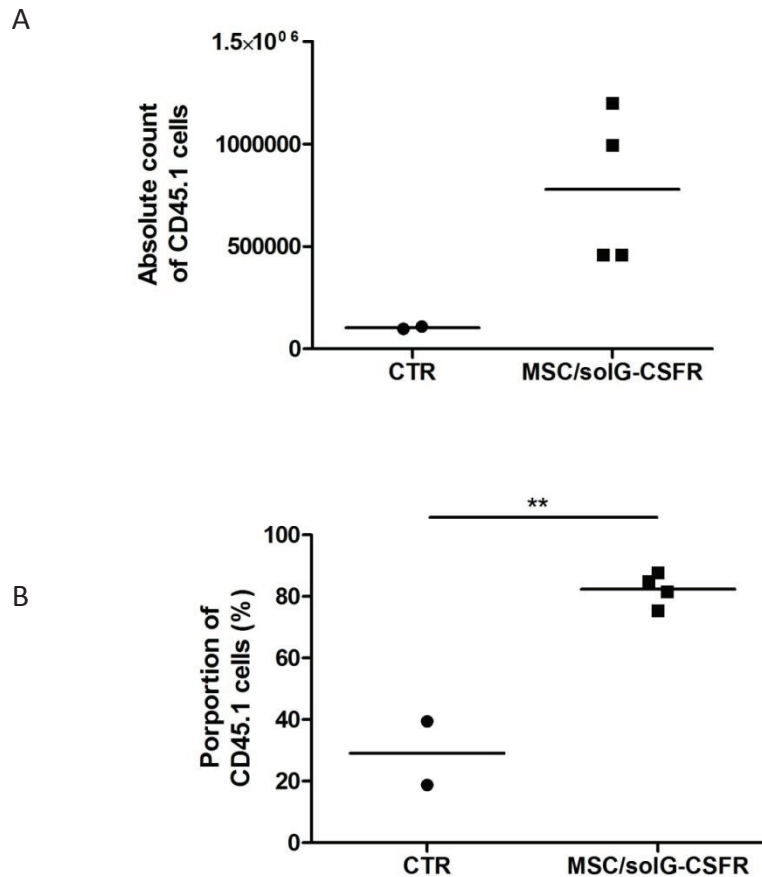


Figure A.1.1: Injection of bone marrow stromal cells (MSC) expressing solG-CSFR improved hematopoietic reconstitution post IR. CD45.2 irradiated (10 Gy) recipients mice were injected intravenously (tail vein) or not (control CTR) with 5×10^4 MSC/solG-CSFR 5 days prior to transplantation of 5×10^6 CD45.1 whole bone marrow cells. Peripheral blood engraftment 6 weeks following transplantation was determined by flow cytometry analysis of the absolute number (A) and the proportion (B) of CD45.1 cells using CountBright™

absolute counting beads (Invitrogen, Burlington, ON) and CD45.1 antibody (Biolegend, SanDiego, CA).

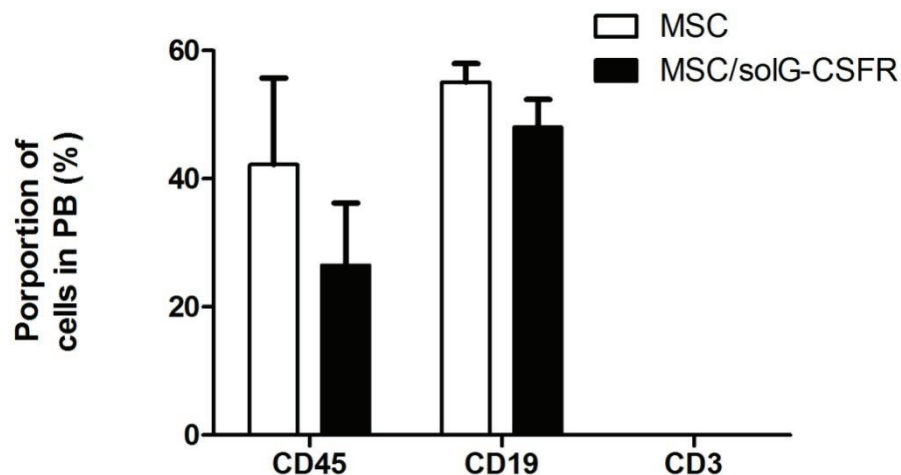


Figure A.1.2: Injection of conditioned media containing solG-CSFR decoy did not improve hematopoietic reconstitution post IR in NOG mice model. NOG irradiated (6 Gy) mice were injected intraperitoneally or not with conditioned media containing solG-CSFR decoy prior to transplantation of 1×10^5 CD34⁺ cord blood-derived cells. Peripheral blood engraftment 6 weeks following transplantation was determined by flow cytometry analysis of the proportion of CD45, CD19 and CD3 cells using hCD45, hCD19 and hCD3 antibodies (Biolegend, SanDiego, CA). n=6-7 mice per group.